



# Mécanismes de sécrétion d'ATP et d'exposition de la calréticuline au cours d'une chimiothérapie immunogène

Yidan Wang

## ► To cite this version:

Yidan Wang. Mécanismes de sécrétion d'ATP et d'exposition de la calréticuline au cours d'une chimiothérapie immunogène. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T045 . tel-01082578

**HAL Id: tel-01082578**

**<https://theses.hal.science/tel-01082578>**

Submitted on 13 Nov 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :  
DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire : INSERM U1138 équipe « *Apoptose, cancer et immunité* »

## THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

**Yidan WANG**

Mécanismes de sécrétion d'ATP et d'exposition de la calréticuline au cours d'une chimiothérapie immunogène

Date de soutenance : **19/09/2014**

**Composition du jury :**

Directeur de thèse :  
Recherche des Cordeliers)

Pr. Guido KROEMER

Directeur de Recherche (Centre de

Rapporteurs :

Dr. Mojgan DJAVAHERI-MERGNY  
Pr. Eric TARTOUR

HDR (Institut Bergonié)  
PU-PH, HDR (Hôpital Européen Georges

Pompidou)  
Examineurs :

Pr. Jean-Marc CAVAILLON  
Dr Jérôme GALON

Directeur de Recherche (Institut Pasteur)  
Directeur de Recherche (Centre de

Recherche des Cordeliers)



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord le professeur Guido Kroemer, mon directeur de thèse, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, et de m'avoir offert la possibilité de réaliser ces trois années de thèse dans une aussi grande équipe de renommée mondiale. Je suis ravie d'avoir eu l'opportunité de travailler sous sa direction, d'avoir pu profiter des connaissances et des conseils avisés de ce chercheur d'exception.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury :

Le professeur Jean-Marc Cavaillon, qui m'a toujours soutenu dans la voie de la recherche. Je vous remercie de m'avoir offert la chance d'intégrer votre équipe (où j'ai rencontré plus que de simples collègues de travail !) lors de mon stage de Master, d'avoir été un directeur d'unité formidable. Je vous remercie profondément d'avoir accepté de présider ce jury.

Le docteur Mojgan Djavaheri-Mergny et le professeur Eric Tartour pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie pour tout le temps et l'investissement considérable que vous m'accordez.

Je remercie le professeur Jérôme Galon d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail.

Il faudrait inventer un mot pour dire à quel point je te remercie Isabelle. Cette thèse n'a été possible que parce que tu as été là. J'ai été chanceuse d'avoir pu travailler avec toi et j'en garde de très bons souvenirs (notamment quand on avait toutes les deux la grippe en pleine soumission du papier !). Merci pour ton aide, ta présence, ton amitié.

Merci à Lynda, Sabrina et à Norma pour tous les bons moments passés ensemble !  
Merci pour votre disponibilité, votre soutien et tous les fous rires !

Merci à Yohann, John P, Sarah, Nadine, Florine, Céline et Yuting pour votre solidarité et votre bonne humeur ! Grâce à vous, j'ai passé de super moments !

Merci à Sylvie et à Didier, le duo de choc, sans qui ce laboratoire ne serait pas le même !

Merci aux autres membres du laboratoire avec qui je me suis liée d'amitié et passé de bons moments: Elisa, Erika, Federico, Valentina Sica, Chema, Valentina Izzo, Fernando, Itziber, Laura, Mireia, Guillermo, Lorenzo, Yang Heng, Zhou Heng, Huang Xing, Hesti, Kevin, Haiwei, Sylvère, Alexis, David et Gauthier.

Merci aux « anciens » de notre unité, Audrey, Ming Ming, Laurent. Ce fut un vrai plaisir d'avoir pu travailler avec vous !

Merci aux titulaires pour leur gentillesse et leurs conseils : Maria, Chiara, Oliver, Naoufal, Nazanine, Aména.

Je garde de ces trois années de merveilleux souvenirs grâce à vous tous.



Je dédie cette thèse :

A mes parents, qui m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé dans les moments les plus difficiles.

A ma cousine Nan que j'adore.

A mes grands-parents.

Et enfin à Allan, mon formidable « élève » avec qui j'ai pu avoir la chance de travailler. Un immense merci d'être mon soutien au quotidien, aussi bien dans la vie professionnelle que privée.

## RESUME

Pendant très longtemps, les traitements contre les cancers se sont basés sur la cytotoxicité des chimiothérapies, sur leur capacité à tuer directement les cellules malignes ou à induire leur senescence. Mais cette cytotoxicité accrue et non ciblée a également pour effet de tuer les cellules du système immunitaire du patient. Cependant, il a été montré que la radiothérapie, les anthracyclines ainsi que l'oxaliplatine étaient capables d'induire une apoptose décrite comme étant une mort cellulaire immunogène. De ce fait, les cellules tumorales mourantes agiront comme vaccin thérapeutique.

La mort cellulaire immunogène se caractérise par trois grands marqueurs : un stress du réticulum endoplasmique pré-mortem qui va induire la translocation de la calréticuline de la lumière du réticulum endoplasmique vers la surface cellulaire, la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire permettant le recrutement des cellules dendritiques et l'activation de l'inflammasome NLRP3 *via* le récepteur P2RX7, et enfin la libération de la protéine HMGB1 dans le milieu extracellulaire, qui va aller interagir avec TLR4 à la surface des cellules dendritiques pour stimuler leur fonction présentatrice d'antigène.

La première partie de ce travail a consisté à comprendre les mécanismes moléculaires précis par lesquels l'ATP est sécrétée activement lors d'une mort cellulaire immunogène. En utilisant une combinaison de techniques impliquant des criblages pharmacologiques, des techniques de monitoring de la localisation intracellulaire de l'ATP entre autres, nous avons montré qu'après un traitement par les inducteurs de la mort immunogène, l'ATP était redistribué des lysosomes aux autolysosomes et que sa sécrétion requiert la protéine lysosomale LAMP1. Nous avons également montré qu'il existait d'autres voies de libération d'ATP telles que la voie de signalisation Rho, et également l'ouverture des hémicanaux pannexine 1 (PANX1). De façon surprenante, nous avons observé une implication de PANX1 dans la translocation de LAMP1 à la surface cellulaire. Ces résultats ont permis de comprendre un peu plus précisément les mécanismes de sécrétion d'ATP dans la mort cellulaire immunogène, mettant en évidence l'importance de l'exocytose lysosomale caspases dépendante et PANX1 dépendante.

La seconde partie de ce travail s'est portée sur l'étude d'une autre caractéristique de la mort cellulaire immunogène, à savoir l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire. En partant du constat qu'après un traitement par la mitoxantrone, la calréticuline était relocalisée en périphérie à la fois dans les cellules humaines et les

cellules de levure, il a été suggéré que la voie d'exposition de la calréticuline était conservée phylogénétiquement. Nous avons montré que les phéromones pouvaient agir comme inducteurs physiologiques de l'exposition de la calréticuline dans les cellules de levure. Un criblage d'ARN interférant et des analyses de transcriptome nous ont permis de montrer que les chimiokines, en particulier CXCL8 chez l'humain (appelé également interleukine-8) et son orthologue Cxcl2 chez la souris étaient impliquées dans la translocation de la calréticuline à la surface cellulaire. En traitant les cellules cancéreuses par la mitoxantrone, nous observons une production de CXCL8 par les cellules cancéreuses humaines *in vitro* et de Cxcl2 par les cellules cancéreuses murines *in vivo*. Un « knockdown » des récepteurs pour CXCL8/Cxcl2 réduit de manière significative l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire. Ces résultats ont donc montré l'importance des chimiokines dans la voie d'exposition de la calréticuline. L'ensemble de ce travail a permis de comprendre plus en détails deux des trois grandes caractéristiques de la mort cellulaire immunogène.

## SUMMARY

Cytotoxic anti-neoplastic agents were considered for a long time to mediate their therapeutic effects *via* their capacity to directly kill malignant cells. Nevertheless, this high cytotoxicity is non-targeted and will eventually diminish immune cells. During the last years, it has been shown that radiotherapy and some anticancer agents, such as anthracyclines and oxaliplatin, can stimulate actively anti-tumor immune responses. In fact, they can induce an immunogenic type of apoptosis, which we termed immunogenic cell death (ICD). Thereby, dying cells can act as therapeutic vaccine against residual cancer cells that overcame the initial treatment.

ICD is characterized by three major hallmarks: a pre-mortem stress of the endoplasmic reticulum (ER), which triggers the translocation of the ER chaperone protein called calreticulin (CRT) to the cell surface, the secretion of ATP from apoptotic cells, which acts as a signal for the recruitment of dendritic cells and for the activation of the NLRP3 inflammasome *via* its receptor P2RX7, and the release of HMGB1 into the extracellular space, allowing it to interact with TLR4 and thus stimulate the antigen-presenting functions of the DCs.

The first part of my work focused on the precise molecular mechanisms by which ATP is actively secreted during ICD. Using a large panel of techniques, including chemical compounds screens and monitoring the subcellular localization of ATP, we showed that following treatment of various tumor cells with ICD inducers, ATP is redistributed from lysosomes to autolysosomes and the lysosomal protein LAMP1 is required for active ATP secretion. We also showed that Rho and pannexin 1 (PANX1) are indispensable for efficient ATP release in response to ICD inducers. Surprisingly, we observed an unexpected link between PANX1 and the exposure of LAMP1 at the cell surface. These results will help to understand the mechanisms necessary for ATP secretion during ICD. In the second part of this work we further studied the surface exposure of CRT during ICD. We observed that mitoxantrone (MTX), which belongs to the group of anthracyclines, can induce a peripheral relocation of CRT, both in human cells and yeast cells. In addition, we showed that pheromones can act as a physiological inducer of CRT translocation in yeast. Focused siRNA screening combined with transcriptome analyses revealed that human CXCL8 (also called interleukin-8) and its mouse ortholog Cxcl2 play an essential role in the translocation of CRT to the cell surface. Interestingly,

MTX-treated human cancer cells displayed an elevated production of CXCL8 *in vitro*. These results were confirmed *in vivo*, with MTX treated murine tumors, which also displayed elevated Cxcl2 levels. The MTX-induced CRT exposure was significantly reduced when we performed a knockdown of CXCL8/Cxcl2 receptors. Altogether, these results showed the importance of chemokine signaling circuitries in immunogenic CRT exposure.

This work allows for the detailed understanding of the mechanisms of ICD and might thus be useful for further targeted drug development.

## ABREVIATIONS

ARN : Acide Ribonucléique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AIF : Apoptosis-Inducing Factor

APAF-1 : Apoptosis Protease Activating Factor 1

APC : Cellule Présentatrice d'Antigène

ATF6 : Activating Transcription Factor 6

ATP : Adenosine 5' -Triphosphate

BCG : Bacillus Calmette-Guérin

BCR : B cell Receptor

Bcl-2: B-cell Lymphoma 2

BH : Bcl-2 homology

Ca<sup>2+</sup>: Calcium

CDDP: Cisplatine

CFU : Colony-Forming Unit

CRT: Calréticuline

Cyt *c* : Cytochrome *c*

CMH I ou II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité I ou II

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

DC : Cellules Dendritiques

DIDS : 4,4' -diisothiocyano-2,2' -stilbenedisulfonic acid

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

DX : Doxorubicine

eIF2 $\alpha$  : Eukaryotic Translation Initiation Factor

ER: Reticulum Endoplasmique

ERp57 : ER protein of 57 kDA

FADD : Fas-associating Death Domain-containing Protein

G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HMGB1 : High Mobility Group Box 1

HSP : Heat Shock Protein

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein

ICD : Immunogenic Cell Death

IFN- $\gamma$  : Interferon- $\gamma$

IL-1, 2, 3, etc... : Interleukine 1, 2, 3, etc...

i.p. : intrapéritonéal

IRE1 : Inositol-Requiring Enzyme 1

i.t. : intratumoral

LAMP1 : Lysosomal-Associated Membrane Protein 1

LC3: microtubule-associated protein Light Chain 3

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

LTc : Lymphocyte T cytotoxique

LTh : Lymphocyte T helper

MC : Mitomycin C

M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1

MTX : Mitoxantrone

mTOR : mammalian target of rapamycin

myD88 : Myeloid differentiation primary response protein

Na<sup>+</sup> : Sodium

NK : Natural Killer

NLRP3 : NOD-Like Receptor family, pyrin domain containing-3 protein

OXA : Oxaliplatine

PAMPs: Pathogene-Associated Molecular Patterns

PANX1 : Pannexin 1

PERK : Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PDIA3 : Protein Disulfide Isomerase Family A, member 3

PD-L1 : Programmed cell Death Ligand 1

PRR : Pattern Recognition Receptor

PTX : Pertussis Toxin

rCRT : recombinant calreticulin

ROCK1: Rho-associated Coiled-coil containing protein Kinase 1

ROS : Reactive Oxygen Species

SCID : Sever Combines Immunodeficient

Smac/DIABLO : Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP Binding Protein with a low pI

SNAP : Synaptosome Associated Protein

SNARE : SNAP Receptor

Stat3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TAMs : Tumor-Associated Macrophages

TANs : Tumor-Associated Neutrophils

tBid : truncated Bid

TCR : T cell Receptor

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor- $\beta$

Th : T helper

TLR-4 : Toll-Like Receptor 4

TMRM : TetraMethylRhodamineMethyl ester

tPANX1 : truncated pannexin 1

T<sub>regs</sub> : Lymphocytes T régulateurs

TRIF : Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN $\alpha$

UPR : Unfolded Protein Response

VAMP1 : Vesicle-Associated Membrane Protein 1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VNUT : Vesicular Nucleotide Transporter

WT : Wild-Type, sauvage

YEPD : Yeast Extract Peptone Dextrose



# SOMMAIRE

## Contents

REMERCIEMENTS.....	2
RESUME .....	4
SUMMARY .....	6
ABREVIATIONS.....	8
SOMMAIRE.....	11
INTRODUCTION.....	13
PARTIE I.....	15
1) Immunité anti-tumorale.....	15
1.1) Système immunitaire inné et adaptatif .....	17
1.1.1) Macrophages .....	19
1.1.2) Neutrophiles.....	21
1.1.3) Cellules Dendritiques .....	22
1.2) Rôle du système immunitaire dans la reconnaissance des cellules tumorales.....	24
1.3) Notion d'immunoediting.....	27
1.3.1) Elimination.....	29
1.3.2) Equilibre.....	29
1.3.3) Echappement .....	31
Conclusion sur les trois E.....	31
1.4) Microenvironnement tumoral immunosuppresseur.....	32
1.4.1) Myeloid-derived suppressor cells.....	33
1.4.2) L <sup>T</sup> <sub>régs</sub> .....	34
Conclusion Partie I.....	37
PARTIE II .....	39
2) Mort et survie cellulaire.....	39
2.1) Apoptose.....	41
2.2) Autophagie.....	45
Conclusion Partie II.....	50
PARTIE III.....	51
3) La Mort Cellulaire Immunogène.....	51
3.1) Calréticuline et ERp57 : signal de danger.....	53
3.2) Heat shock proteins .....	57
3.3) HMGB1 et TLR 4.....	58

3.4) ATP et récepteurs purinergiques.....	60
3.4.1) ATP et mort cellulaire immunogène.....	62
3.5) Pannexine 1.....	64
Conclusion Partie III.....	67
Objectif de l'étude et données préliminaires.....	69
Matériels et Méthodes.....	71
Résultats .....	85
1) Identification des mécanismes de libération d'ATP après une chimiothérapie immunogène..	85
2. Identification de la chimiokine CXCL8 dans la voie d'exposition de la calréticuline.....	117
Conclusion et Discussion .....	136
1) Mécanismes de libération d'ATP .....	136
2) Implication de CXCL8 comme inducteur d'exposition de la CRT .....	141
Références bibliographiques.....	145

## INTRODUCTION

Actuellement en France, le cancer représente la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme. Selon les données de l'Institut National du Cancer, il a été observé en 2012, 355 354 nouveaux cas de cancer : 200 350 chez l'homme et 155 004 chez la femme. Le cancer de la prostate reste le plus fréquemment observé chez l'homme, avec 53 465 nouveaux cas estimés en France en 2012, devançant nettement le cancer du poumon (28 211 nouveaux cas estimés) et le cancer colorectal (23 226 nouveaux cas estimés), et représentant ainsi 26.7% des cancers masculins observés en 2012. Chez la femme, c'est le cancer du sein qui est le plus fréquemment observé (48 763 nouveaux cas estimés), suivi du cancer colorectal (18 926 nouveaux cas estimés) et du cancer du poumon (11 284 nouveaux cas estimés). Malgré les avancées médicales récentes, avec un diagnostic précoce et une prise en charge rapide des patients, on dénombre un grand nombre de décès de personnes atteintes de cancers. En 2012, chez l'homme, le cancer du poumon a causé le décès de 21 326 personnes, le cancer colorectal 9 275 décès et le cancer de la prostate 8 876 décès. Chez la femme, le cancer du sein a été responsable de 11 886 décès, le cancer colorectal de 8 447 décès et le cancer du poumon de 8 623 décès (ces données sont disponibles sur le site internet <http://lesdonnees.e-cancer.fr/>). Il reste donc encore primordial d'améliorer les traitements proposés aux patients, pour aboutir dans l'idéal à un traitement personnalisé pour chacun d'entre eux.

Au cours des dernières décennies, les traitements anti-cancéreux ont beaucoup évolué, mais également la conception même du cancer. L'étude de ce dernier ne se résume plus qu'à la simple cellule tumorale isolée de son environnement, mais à l'étude de l'ensemble « cellule + environnement ». Cela a conduit, en 2000, à l'établissement de 6 marqueurs déterminant l'oncogenèse précoce, communs à toute cellule tumorale : l'échappement à l'apoptose, le maintien de signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux répresseurs de croissance, une invasion tissulaire et métastatique, un potentiel réplcatif sans limite et l'induction d'une néo-angiogénèse (Hanahan and Weinberg 2000). C'est pour cela qu'aujourd'hui, même si les études *in vitro* restent nécessaires, des études *in vivo* sont devenues essentielles pour étudier l'interaction de la tumeur avec son « micro-environnement ». De ces études sont apparus, en 2011, de nouveaux marqueurs de la cellule tumorale: l'échappement à l'immunosurveillance en fait partie,

mettant ainsi en évidence le rôle du système immunitaire, qui a été jusque-là, délaissé dans les recherches anti-tumorales (Hanahan and Weinberg 2011).

C'est dans l'optique de mieux comprendre le rôle du système immunitaire dans la lutte anti-cancéreuse, que notre laboratoire a montré que certaines chimiothérapies, telles que les anthracyclines ou encore l'oxaliplatine, avaient la capacité d'induire une mort cellulaire immunogène. Les cellules tumorales mourantes traitées par ces chimiothérapies vont agir comme un vaccin chez le patient, et permettre la mise en place d'une immunité anti-tumorale à long terme qui évitera ainsi les rechutes.

Trois grandes caractéristiques de la mort cellulaire immunogène ont été mises en évidence au sein de notre équipe : l'exposition à la surface cellulaire de la calréticuline, une protéine chaperonne qui est en temps normal présente dans le réticulum endoplasmique, le relargage d'HMGB1 (High Mobility Group Box 1), une protéine nucléaire, dans le milieu extra-cellulaire, et la libération d'ATP (Adénosine 5' - TriPhosphate).

Mon travail a essentiellement consisté à étudier la libération d'ATP et l'exposition de la calréticuline comme signaux de mort immunogénique.

# PARTIE I

## 1) Immunité anti-tumorale.

La réponse immunitaire joue un rôle majeur dans la défense de l'organisme contre les tumeurs. La théorie de l'immunosurveillance des tumeurs fut énoncée en premier par Paul Ehrlich en 1909, mais ne fut reprise qu'en 1950 par Brunet et Thomas, notamment grâce au développement des outils qui permettent d'étudier le système immunitaire. Leurs travaux reposaient sur les différentes observations de Cooley, qui proposait une corrélation entre une infection par un *streptococcus pyogenes* et la régression de sarcomes osseux, à savoir l'hypothèse que la réaction inflammatoire produite par l'infection permettait de contrôler la croissance tumorale. De nos jours, la théorie de l'immunosurveillance, qui explique l'interaction entre immunité et croissance tumorale repose sur la théorie des trois Es : Elimination des cellules tumorales par le système immunitaire, Equilibre dynamique qui permet aux cellules tumorales d'être sous le contrôle du système immunitaire sans pour autant être détruites, et l'Echappement des cellules tumorales au système immunitaire amenant à la formation d'une tumeur. Les premières expériences *in vivo* avec des souris immunodéficientes CBA/H ne furent pas convaincantes (Stutman 1974). En effet, tout comme les souris sauvages (wild-type, WT) ces souris immunodéficientes développèrent des tumeurs spontanées après exposition au méthylcholanthrene (MCA), un produit hautement carcinogène (Engel, Svane et al. 1997). Nous savons désormais que les souris immunodéficientes CBA/H possèdent en très grand nombre une isoforme de l'enzyme métabolisant le MCA, empêchant ainsi de voir une quelconque différence entre les souris CBA/H et les souris WT. Depuis ces premières expériences, nous disposons d'un très grand panel de souris déficientes pour un ou alors pour plusieurs acteurs du système immunitaire. Ainsi, les souris déficientes pour les gènes RAG (recombination activating gene), qui codent les enzymes responsables du réarrangement des gènes des immunoglobulines et du récepteur T, sont totalement dépourvues de lymphocytes B et T, populations de cellules indispensables pour le système immunitaire adaptatif. Elles présentent une fréquence plus importante d'apparition de tumeurs spontanées et de tumeurs chimio-induites par rapport aux souris WT. Il a été démontré par la suite que les cellules T  $\alpha\beta$  ainsi que les T

$\gamma\delta$  étaient essentielles dans l'élimination des cellules tumorales induites par le MCA (Girardi, Oppenheim et al. 2001). D'autres travaux ont confirmé ces résultats en utilisant des souris déficientes en cellules ou molécules importantes pour l'immunité innée, telles que les souris déficientes en cellules NK (Natural Killer), STAT (signal transducer and activator of transcription) et des souris déficientes pour l'immunité adaptative, telles que les souris nude (Stutman 1974, Stutman 1979, Smyth, Crowe et al. 2001). La combinaison d'une déficience en cellules T et en cellules NK amène une fréquence encore plus élevée de souris développant une tumeur, suggérant l'idée que le système inné contribue aussi bien que le système adaptatif à l'immunosurveillance ainsi qu'à l'éradication des tumeurs (Teng, Swann et al. 2008). Des arguments épidémiologiques chez l'Homme ont également été observés. Il a été montré que les infiltrats tumoraux par les cellules du système immunitaire étaient très hétérogènes et variaient d'un patient à un autre. Tous les types de cellules immunitaires peuvent être trouvés au sein de la tumeur, incluant les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les natural killer, les lymphocytes B et T. Ces cellules peuvent aussi bien être localisées au centre de la tumeur qu'à sa périphérie. L'analyse de la localisation, de la densité et de l'orientation fonctionnelle des différentes populations des cellules immunitaires ont permis l'identification de contextes immuns pouvant être bénéfiques ou délétères pour le patient (Fridman, Pages et al. 2012).

De plus, il a été rapporté une corrélation entre l'augmentation de la fréquence de certains cancers et différentes situations cliniques associées à un déficit immunitaire touchant les lymphocytes T. Par exemple les personnes touchées par la Trisomie 21 présentent un déficit fonctionnel des lymphocytes T, et également un taux de leucémie vingt fois plus élevé que la population normale. Il a également été rapporté dans de nombreuses études que l'incidence des cancers, notamment des lymphomes non hodgkiniens, était augmentée de façon drastique chez les patients suivant des traitements immunosuppresseurs après une transplantation d'organes (Sheil, Flavel et al. 1985, Birkeland, Storm et al. 1995, Penn 1995). D'autre part, il a été reporté une corrélation entre la présence de cellules CD3<sup>+</sup> et le devenir favorable des patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens à un stade avancé (Zhang, Conejo-Garcia et al. 2003). Naito et al, ont montré qu'une infiltration tumorale importante en cellules T CD8<sup>+</sup> était associée à une meilleure survie des patients atteints de cancers colorectaux (Naito, Saito et al. 1998).

Mais le système immunitaire peut également favoriser le développement tumoral : c'est le concept d'« immunoediting » et d'échappement tumoral. Les cellules très immunogènes sont reconnues et éliminées par le système immunitaire dans les hôtes immunocompétents, mais les cellules peu immunogènes y échappent (Khong and Restifo 2002). Ces cellules vont alors se multiplier, générer des variants tumoraux insensibles au système immunitaire et l'apparition de tumeurs agressives (Smyth, Dunn et al. 2006). Mais les cellules tumorales peuvent également exercer un échappement actif au système immunitaire. En effet, elles peuvent induire la sécrétion de cytokines immunosuppressives, telles que TGF $\beta$  ou Il-10, induire l'expression du ligand PD-L1 (programmed death ligand 1) qui va inhiber les lymphocytes T effecteurs, induire le recrutement de cellules inflammatoires immunosuppressives telles que les MDSCs (Myeloid derived suppressor cells) ou les LT<sub>regs</sub> (Lymphocytes T régulatrices) (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001).

Les cellules tumorales peuvent également induire le relargage de MICA soluble, qui va constituer un leurre pour le récepteur NKG2D. MICA constitue un marqueur plasmatique de la progression tumorale (Groh, Wu et al. 2002).

Il est donc admis que les tumeurs sont infiltrées par plusieurs types de cellules du système immunitaire : certaines pro-inflammatoires et d'autres anti-inflammatoires. Le système immunitaire présente donc une dualité dans le rôle qu'il joue dans la régression ou la progression de la tumeur.

## **1.1) Système immunitaire inné et adaptatif**

Le système immunitaire est un ensemble complexe qui permet la reconnaissance du « soi » et du « non-soi » et qui constitue la défense de l'hôte contre les pathogènes (comme par exemple les virus, bactéries, parasites et certaines molécules comme le poison). Il est constitué par la réponse immunitaire innée, qui se déclenche immédiatement à la suite de la détection du pathogène et qui se fait de manière non spécifique, et de la réponse immunitaire adaptative, qui est plus lente à se mettre en place mais qui est plus ciblée. Il existe tout d'abord des barrières physiques, tels que la peau, qui est le premier et le plus important élément du système de défense : elle prévient l'entrée de la plupart des corps étrangers. Les muqueuses constituent également une barrière physique : le positionnement des cellules rendent les

muqueuses imperméables à la plupart des pathogènes et la surface de certaines muqueuses est recouverte de mucus et de cils qui vont immobiliser et évacuer vers l'extérieur la plupart des particules et corps étrangers. Le système immunitaire inné fait intervenir plusieurs types cellulaires après reconnaissance des DAMPs et des PAMPs (Damage ou Pathogene-associated molecular patterns respectivement) par les PRR (Pattern recognition receptor), dont font partie les TLRs (Toll like receptors) (Chow, Moller et al. 2012). Parmi les acteurs du système immunitaire inné, on retrouve un ensemble de protéines constituant le système du complément et agissant par une cascade protéolytique. Normalement inactives, elles sont activées par les substances présentes à la surface de beaucoup de pathogènes. La cascade de réactions engendrées va induire le recrutement de cellules immunitaires, va permettre de recouvrir les pathogènes et de les éliminer par opsonisation, d'éliminer les pathogènes en induisant des perforations, et d'éliminer les complexes immuns. Les cellules du système immunitaire inné comprennent les cellules Natural Killer (cellules NK), les mastocytes, granulocytes (éosinophiles, basophiles et neutrophiles) et les phagocytes (macrophages et les cellules dendritiques). Ces cellules font parties de la première ligne de défense de l'organisme. Les mastocytes, qui résident dans les tissus conjonctifs et les muqueuses tout comme les granulocytes, qui sont des globules blancs qualifiés de « non spécifiques ». Ils sont caractérisés par la présence d'un très grand nombre de granules dans leur cytoplasme contenant des médiateurs chimiques, qui seront déversés pour combattre les agents infectieux. Les neutrophiles sont des phagocytes au même titre que les macrophages et les cellules dendritiques, mais possèdent une durée de vie bien moins importante. Le rôle des neutrophiles dans le cancer reste controversé. En effet, il existe un phénotype N1 dans lequel les neutrophiles qui sont associés aux tumeurs exercent un effet pro-inflammatoire et antitumorigénique, et un phénotype N2 dans lequel les neutrophiles maintiennent un état pro-tumorigénique (Fridlender and Albelda 2012). Les macrophages sont des cellules de grande taille, qui se sont différenciées dans les tissus à partir de monocytes circulants. La reconnaissance des motifs pathogènes par les récepteurs se trouvant à la surface des macrophages amène à la phagocytose et à la destruction des agents infectieux, et à une production de chimiokines qui vont recruter d'autres types cellulaires sur le site de l'infection. Tout comme les neutrophiles, le rôle des macrophages dans le cancer reste controversé : Ils peuvent induire un phénotype M1 qui sera anti-tumoral, ou alors un phénotype M2 pro-tumoral (Sica, Larghi et al.



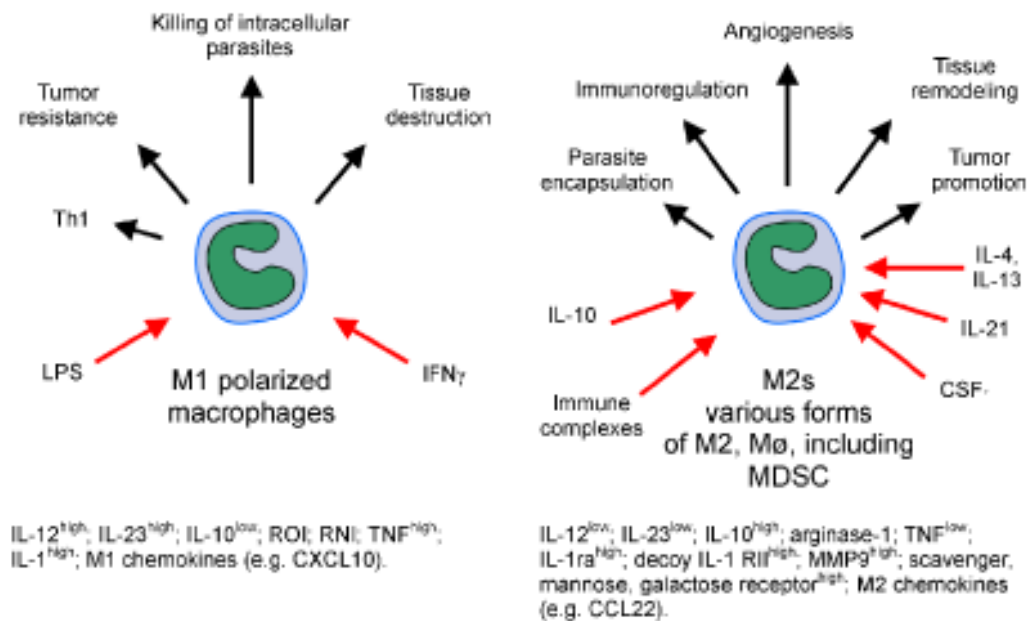
2008). Les cellules NK reconnaissent les cellules dont la fonction est altérée, comme les cellules tumorales, qui ont une expression plus faible de CMH de classe I à leur surface, et vont les détruire. Les cellules NK sont aussi capables de sécréter de l'IFN- $\gamma$  et de présenter des inhibiteurs spécifiques du CMH I. Les cellules dendritiques sont des cellules dotées de la capacité de phagocytose et sont caractérisées morphologiquement par des extensions de la membrane plasmique. Elles sont essentielles car elles constituent le lien entre immunité innée et immunité adaptative. En effet, après phagocytose et destruction de l'agent pathogène, de par leur fonction présentatrice d'antigène, les cellules dendritiques (DCs) vont activer les lymphocytes T et permettre la mise en route de la réponse immunitaire adaptative.

Comme son nom l'indique, la réponse immunitaire adaptative est spécifique de l'agent pathogène détecté. Elle est mise en place dans un second temps, quelques jours après le déclenchement de la réponse immunitaire innée. Les acteurs de la réponse adaptative sont les lymphocytes. Les deux principaux types sont les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB) qui peuvent répondre à une multitude d'antigènes grâce à leur répertoire de BCRs (B cell receptor) et TCRs (T cell receptor). Ils sont localisés en temps normal dans les organes lymphoïdes secondaires chez l'adulte. Les LT sont divisés en deux principaux sous-groupes : les LT cytotoxiques (ou LT CD8<sup>+</sup>), capables d'induire la mort par apoptose des cellules infectées ou des cellules cancéreuses, et les LT auxiliaires (ou LT CD4<sup>+</sup>) qui jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien de la réponse immunitaire adaptative. Les LT CD4<sup>+</sup> ont la capacité de diriger la réponse adaptative vers une réponse Th1 ou Th2 (Mosmann, Cherwinski et al. 1986). La réponse Th1 est caractérisée par une sécrétion d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  tandis que la réponse Th2 est caractérisée par une production d'IL-4, IL-5, IL-10 et une prolifération des LB et une sécrétion d'anticorps par ces derniers. A chaque activation du système immunitaire adaptative, une partie des LT et des LB (appelées LT mémoires et LB mémoires) vont permettre la mise en place d'un répertoire et ainsi, l'activation plus rapide du système immunitaire adaptatif lors d'une seconde infection.

### **1.1.1) Macrophages**

Découvertes en 1883 par Elie Metchnikoff, les macrophages sont des cellules du système immunitaire inné infiltrant les tissus et proviennent de la différenciation des monocytes.

Elles sont capables de phagocytose et participent à la défense non-spécifique de l'organisme. Tout comme les DCs, les macrophages sont capables de se comporter comme une cellule présentatrice d'antigène. Cependant, malgré son rôle important et essentiel dans la réponse immunitaire innée, à la fin des années 1970, il a été montré que la croissance tumorale et l'angiogénèse étaient facilitées par une catégorie de macrophages, appelés les TAMs (tumor-associated macrophages). Ainsi, dans un très grand nombre (mais pas tous) de cancers humains, une fréquence élevée de TAMs infiltrant la tumeur est associée à un mauvais pronostic. Cette dualité dans le rôle des macrophages dans le cancer peut s'expliquer par leur polarisation, qui va entraîner un phénotype pro ou anti-tumoral. En effet, la sous-population « classique » M1 des macrophages, qui exerce une activité cytotoxique sur les cellules tumorales et induisant des réactions destructrices au niveau des vaisseaux sanguins, est mise en place suite à une stimulation par l'IFN- $\gamma$  seul ou en combinaison avec un stimulus microbien. Les macrophages M1 sont caractérisés par une grande capacité à présenter les antigènes, une production élevée d'IL-12 et d'IL-23 et une capacité à orienter la réponse des LT vers une réponse de type I (Trinchieri 2003). Ces macrophages ont une activité cytotoxique envers les cellules tumorales et envers les micro-organismes intracellulaires grâce à un relargage important d'intermédiaires toxiques, comme le monoxyde d'azote NO et le TNF (tumor necrosis factor). A l'inverse, la sous-population M2 est activée par différents signaux, comme l'IL-4, l'IL-10 ou encore l'IL-13. Elle présente une faible capacité de présentation antigénique, un phénotype IL-12<sup>low</sup> IL-10<sup>high</sup>, inhibe la réponse de type I et oriente plutôt vers une réponse de type II, et elle induit une angiogénèse accompagnée d'un remodelage du tissu. Le phénotype M2 contribue donc à la progression tumorale et à l'invasion par les cellules cancéreuses. C'est cette sous-catégorie de macrophage qui est communément appelée TAMs (**fig. 1**(Allavena, Sica et al. 2008)).

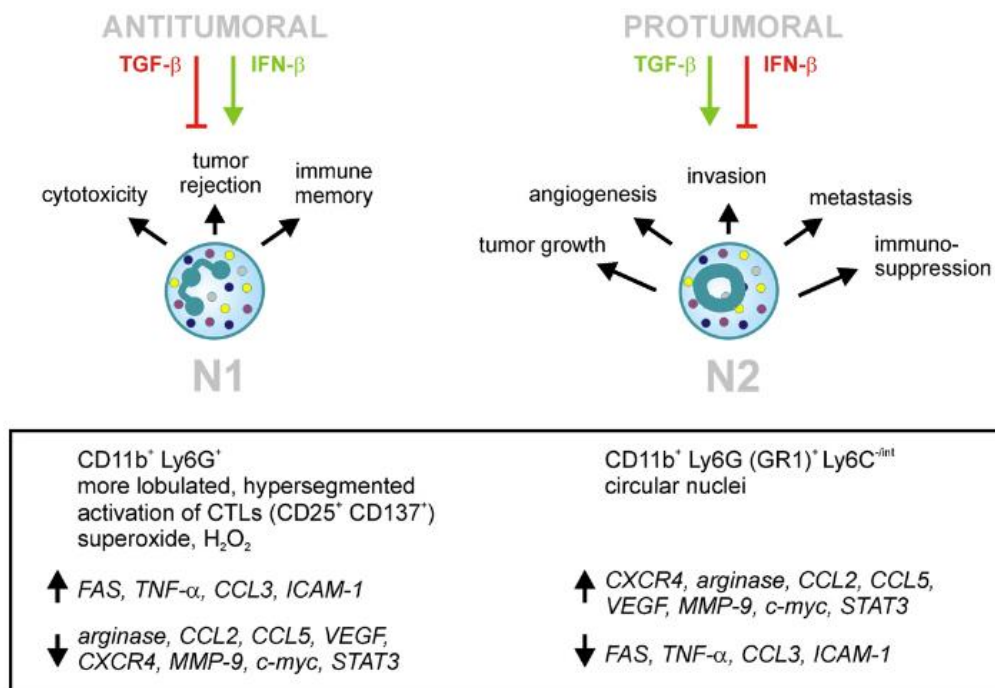


**Fig. 1 Vue simplifiée de la polarisation des macrophages.** Les macrophages classiques M1 sont induits par l'IFN- $\gamma$  seul ou en combinaison avec un stimulus microbien. Les macrophages M2 sont, quant à eux, induits par IL-4, IL-13, les complexes immuns, IL-10 ou encore les glucocorticoïdes. Les M1 sont caractérisés par une grande capacité à présenter les antigènes, produisent IL-12 et IL-23 et induisent une polarisation des lymphocytes T en Th1, ce qui aboutit à une activité cytotoxique envers les cellules cancéreuses. A l'opposé, les M2 disposent d'une faible capacité de présentation antigénique, ont un phénotype IL-12<sup>low</sup> IL-10<sup>high</sup>, inhibent la réponse Th1 et contribuent à l'angiogénèse et à l'invasion tumorale. (Allavena, Sica et al. 2008)

### 1.1.2) Neutrophiles

Les granulocytes neutrophiles sont des cellules sanguines constituant la population leucocytaire prédominante chez les humains. Ils ont un rôle primordial dans les défenses innées par leur capacité d'infiltration tissulaire et à phagocyter lorsqu'ils rencontrent une cellule étrangère ou infectée. Ainsi, lorsqu'ils tuent un micro-organisme envahissant, tel qu'une bactérie, les neutrophiles vont relarguer des cytokines, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 ainsi que des défensines, des ROS (reactive oxygen species) et des substances toxiques. Bien que les neutrophiles sont communément associés à leurs fonctions anti-bactériennes, il est désormais montré qu'il existe une population de neutrophiles, appelée TAN (tumor-associated neutrophils) qui permet la mise en place d'un micro-environnement favorable à la croissance tumorale. En analogie avec les différentes sous-populations des macrophages, il existe deux sous-populations de neutrophiles, appelées N1 et N2. La sous-population N1 permet une augmentation de l'expression de cytokines et chimiokines, induisant l'activation du système immunitaire

et mettant en place une réponse pro-inflammatoire et anti-tumorale. Mais en présence de la cytokine immunosuppressive TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), la réponse est orientée vers la sous-population N2, qui est pro-tumorale (**Fig. 2**(Fridlender and Albelda 2012, Piccard, Muschel et al. 2012)).

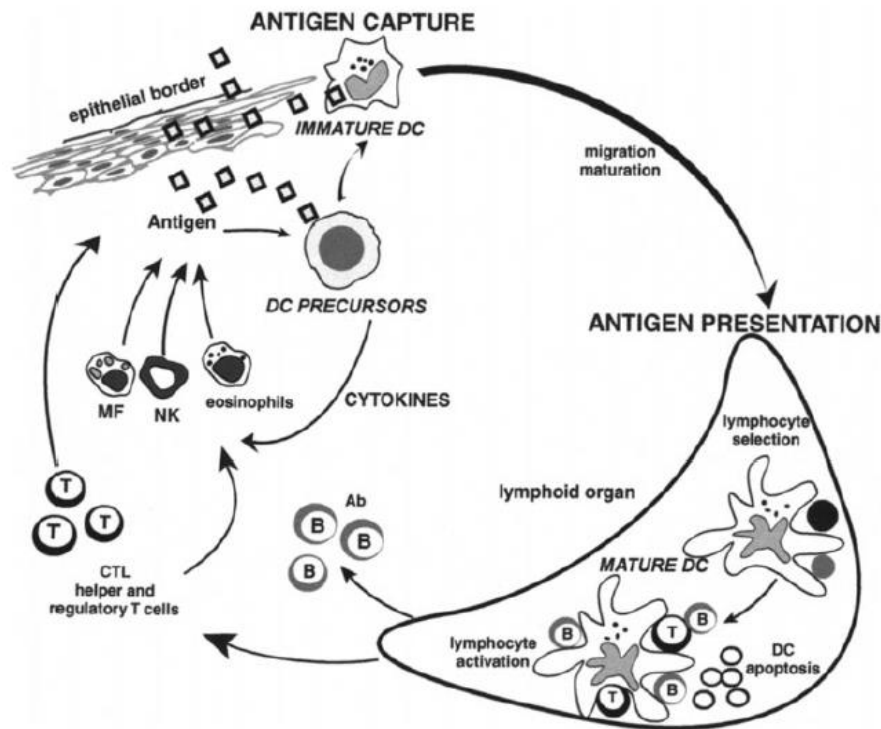


**Fig. 2 Schéma simplifié de la polarisation des neutrophiles.** Les neutrophiles exercent des fonctions à la fois pro et anti-tumoraux. La polarisation des neutrophiles est influencée par les cytokines TGF- $\beta$  et IFN- $\beta$ . Sous l'action d'IFN- $\beta$ , les neutrophiles présentent un phénotype N1 et sont des cellules effectrices antitumorales en induisant la cytotoxicité et le rejet tumoral, ainsi qu'une mémoire immunitaire anti-tumorale. Au contraire, sous l'action de TGF- $\beta$ , les neutrophiles présentent un phénotype N2 et vont promouvoir l'angiogenèse, l'invasion tissulaire, l'induction de métastase et une immunosuppression (Piccard, Muschel et al. 2012).

### 1.1.3) Cellules Dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) ont été découvertes par Ralph Steinman en 1970. Parmi toutes les cellules du système immunitaire, ce sont elles qui possèdent la plus grande capacité de présentation antigénique. Elles induisent les premières la réponse immunitaire et constituent le lien entre réponse innée et adaptative. Les DCs immatures dites conventionnelles sont également appelées les « sentinelles » du système immunitaire, de par leur capacité à circuler dans le sang et à entrer dans les tissus. Ces

DCs immature possèdent une très grande capacité de phagocytose. Lors d'une infection ou de dommage tissulaire, les DCs subissent une maturation après avoir reconnu l'agent pathogène *via* ses récepteurs de surface, tels que les TLR (Toll Like Receptor), et après l'avoir phagocyté. Elles perdent par la suite leur capacité de phagocytose et migrent dans les organes lymphoïdes pour présenter les antigènes aux cellules de l'immunité adaptative (**fig. 3**, (Banchereau, Briere et al. 2000)). Ces DCs matures augmentent ainsi leur expression à la surface cellulaire des complexes de peptides antigéniques associés aux CMH de classe I ou de classe II, et les molécules de co-stimulation comme CD40, CD54, CD80 et CD86. Ceci va permettre l'activation de plusieurs types cellulaires, tels que les lymphocytes T helper CD4<sup>+</sup> (LTh), les lymphocytes T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>) et les lymphocytes B. Les DCs sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1, IL-6, IL-18 et IL-23 (Liu 2001).



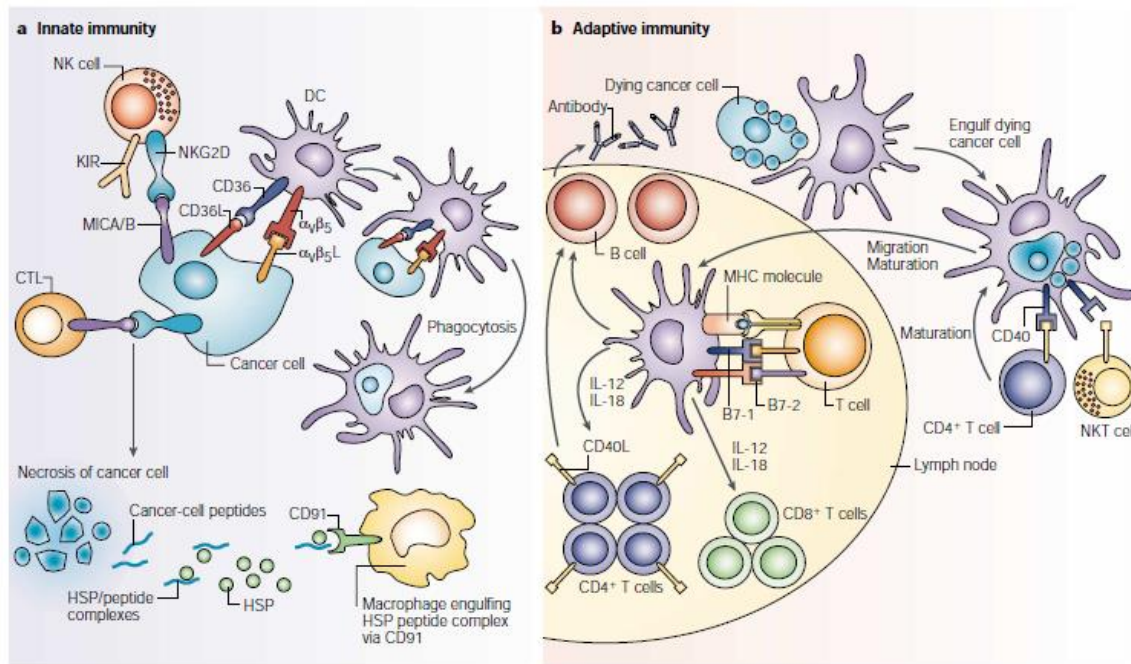
**Fig. 3 Cycle de vie des cellules dendritiques.** Les précurseurs des DCs entrent dans les tissus en tant que DCs immatures. Après capture d'antigènes, les DCs immatures vont migrer vers les organes lymphoïdes où, après maturation, ils vont perdre leur pouvoir de phagocytose, exprimer les complexes majeurs d'histocompatibilité qui permettront par la suite la sélection de lymphocytes spécifiques de l'antigène. Une fois activées, ces cellules T aident à la maturation finale des DCs, ce qui permettra à son tour l'activation de la réponse immunitaire innée, ainsi que la différenciation des lymphocytes. Les lymphocytes T helper (LTh) vont sécréter des cytokines, permettant ainsi l'activation des éosinophiles, macrophages et des cellules NK. Les cellules T cytotoxiques peuvent lyser directement les cellules infectées. Les cellules B deviennent actives après contact avec les lymphocytes T et les DCs, et migrent dans différentes régions où elles produisent des anticorps neutralisant le pathogène initial. Après interaction avec les lymphocytes, il est supposé que les DCs meurent. (Banchereau, Briere et al. 2000).

## 1.2) Rôle du système immunitaire dans la reconnaissance des cellules tumorales

La reconnaissance et la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire se fait à deux niveaux. Tout d'abord, il y a une reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire inné. Les cellules NK, définies phénotypiquement  $CD3^- CD56^+$ , peuvent induire une lyse rapide des cellules sans restriction par le CMH. Ainsi, la cytotoxicité des cellules NK dépend principalement de la balance entre les signaux

activateurs et inhibiteurs. Dans les conditions physiologiques, les cellules expriment à leur surface le CMH de type I, qui est le ligand des récepteurs inhibiteurs se trouvant à la surface des cellules NK, incluant les récepteurs KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors), CD94, NKG2A/B. Les cellules présentant une diminution de l'expression du CMH de type I vont activer la fonction « tueuse » des cellules NK et seront éliminées par ces dernières. Dans le cas des cellules tumorales, on observe une perte de l'expression du CMH de type I, dans le but notamment d'échapper à la surveillance du système immunitaire. Ces cellules seront donc éliminées par les cellules NK. D'autre part, dans des conditions de stress, les cellules tumorales peuvent exprimer des protéines apparentées au CMH I, MICA et MICB. Ces cellules seront également détruites par les cellules NK grâce au récepteur NKG2D, capable de détecter les ligands induits par le stress (Zamai, Ponti et al. 2007, Vivier, Ugolini et al. 2012). Les cellules dendritiques constituent également un acteur essentiel dans la destruction des cellules cancéreuses. Les DCs sont capables d'utiliser CD36 ainsi que les intégrines  $\alpha_v\beta_5$  pour phagocyter les cellules tumorales (Dranoff 2004). Identifiées comme étant les cellules présentatrices d'antigènes les plus efficaces *in vivo*, elles constituent aussi l'interface cruciale entre l'immunité innée et adaptative. En effet, les DCs matures sont capables d'aller stimuler l'activation des LT CD8<sup>+</sup> pour réduire ainsi la masse tumorale. D'autre part, les DCs et les macrophages sont capables de reconnaître, par l'intermédiaire de leur récepteur CD91, les protéines heat-shock qui sont couplées aux protéines chaperonnes libérées par les cellules tumorales mourantes, et d'induire leur phagocytose (Basu, Binder et al. 2001). L'immunité adaptative participe à la destruction des cellules tumorales, notamment par la présentation croisée réalisée par les cellules dendritiques ayant incorporé un antigène étranger et qui le présentent via le CMH I aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les LT CD8<sup>+</sup> sont les lymphocytes infiltrant les tumeurs présentant une activité anti-tumorale des plus importantes. La présentation croisée est essentielle dans la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire adaptatif car les cellules tumorales présentent le plus souvent une perte d'expression des molécules de co-stimulation, à savoir CD80 et CD86 (ou B7-1 et B7-2 respectivement) nécessaires pour induire une réponse des LT. Les DCs ayant phagocyté les cellules tumorales vont, au contraire sur-exprimer les molécules de co-stimulation pour activer les lymphocytes. Les LT CD4<sup>+</sup> interviennent également dans la destruction des cellules tumorales en aidant à la production des anticorps spécifiques des antigènes tumoraux par les LB. L'importance

des différents acteurs du système immunitaire, aussi bien inné qu'adaptatif, fait qu'ils sont de nos jours l'objet d'étude dans le cadre de la mise en place de vaccinations anti-tumorales et de thérapies (Qian, Wang et al. 2014). D'autre part, les cytokines produites par les différents acteurs du système immunitaire font également l'objet d'étude et sont les cibles de différents traitements anti-tumoraux en cours d'étude (**fig. 4**, (Dranoff 2004)).

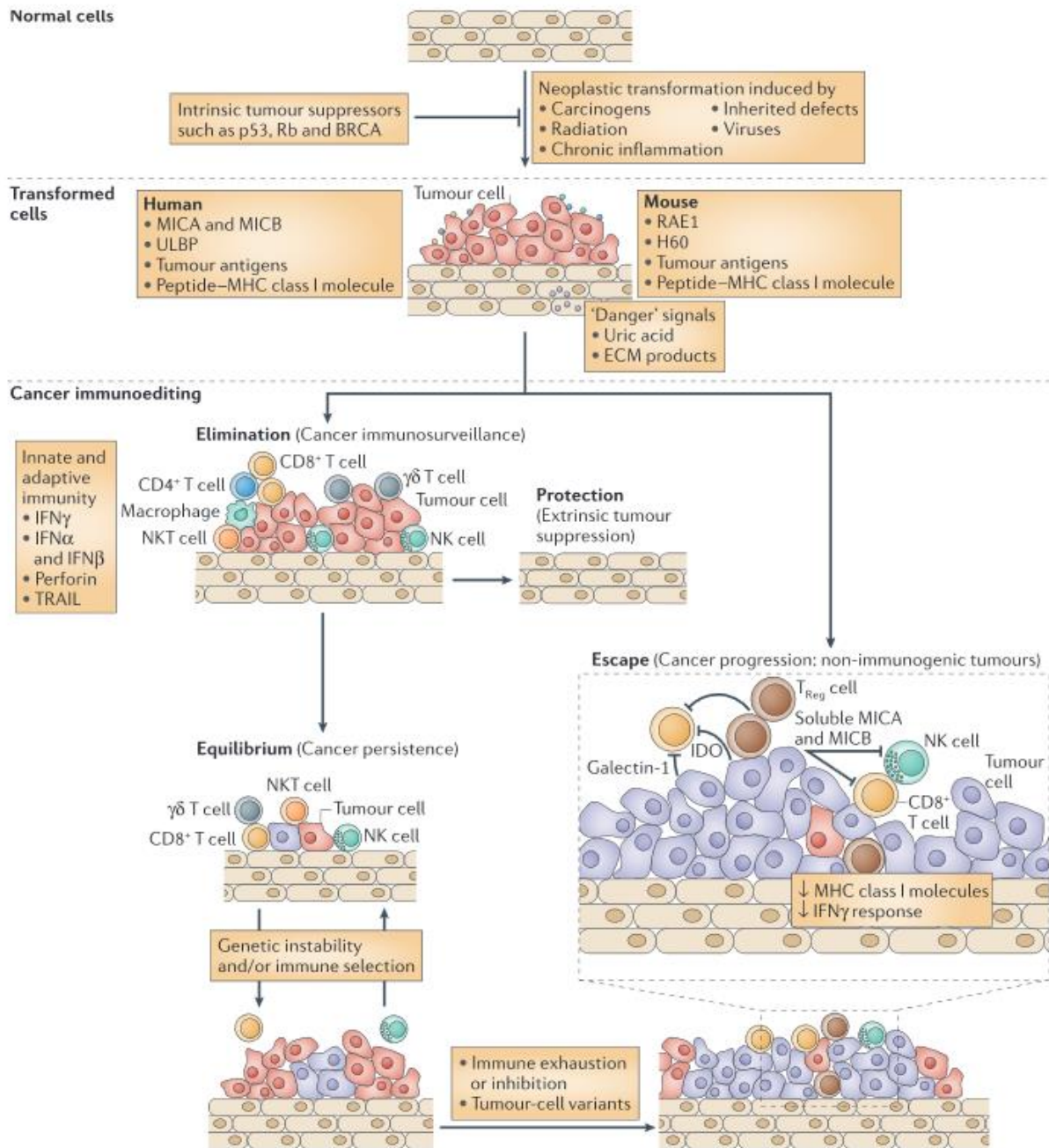


**Fig. 4 Voies de reconnaissance directe et indirecte des cellules cancéreuses.** a) Les cellules de l'immunité innée reconnaissent les cellules cancéreuses *via* des motifs et des molécules de surface. Les cellules tumorales expriment divers gènes induits par le stress tels que MICA et MICB, qui seront reconnus par les récepteurs NKG2D se trouvant à la surface des cellules NK, des macrophages et de certaines lymphocytes T cytotoxiques. Les cellules NK peuvent également utiliser une combinaison de récepteurs inhibiteurs et activateurs tels que KIRs et détecter la perte du CMH 1 à la surface des cellules tumorales. Les macrophages et DCs utilisent également les récepteurs scavengers et CD91 pour prendre en charge le complexe HSPs/peptides tumoraux libérés par les cellules nécrotiques. b) Les cellules dendritiques phagocytent les cellules mourantes et les débris, migrent au niveau des nœuds lymphatiques et présentent les antigènes tumoraux *via* les molécules de type I et de type II du CMH et aux molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2 aux cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> pour activer l'immunité adaptative.(Dranoff 2004)



### 1.3) Notion d'immunoediting

Le concept d'un rôle crucial joué par le système immunitaire dans la reconnaissance et l'élimination de cellules tumorales en absence de toute intervention thérapeutique extérieure existe depuis désormais une centaine d'années. Mais la validation de ce concept a été difficilement acceptée. Lorsqu'elle a été proposée en 1909, cette hypothèse n'a pas pu être validée scientifiquement à cause des manques de moyens expérimentaux et par les manques de connaissances. Après l'abandon de la théorie de l'immunosurveillance dans les années 1950, une étude réalisée en 1994 par Dighe et *al.*, montrant le rôle de l'IFN-  $\gamma$  dans la protection des souris après transplantation de tumeurs a relancé l'intérêt des chercheurs concernant la place du système immunitaire dans la lutte anti-tumorale (Dighe, Richards et al. 1994). Il a été depuis démontré que le système immunitaire, en plus de son rôle protecteur contre le développement tumoral, pouvait également promouvoir la croissance tumorale en sélectionnant les tumeurs avec une faible immunogénicité. C'est ainsi qu'a été mise en place la notion des trois Es dans le concept de l'immunoediting : élimination, équilibre et échappement (**fig. 5**).



**Fig. 5 Concept d'immunoediting.** Les trois phases caractérisant l'immunoediting sont : l'élimination, qui consiste à la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire aussi bien inné (avec l'activation de cellules NK, macrophages et DCs) qu'adaptatif (activation des lymphocytes T CD4 $^+$  et CD8 $^+$  et des lymphocytes B), menant à la destruction des cellules et à la production de chimiokines et de cytokines. Si des cellules tumorales subsistent à la fin de cette phase d'élimination, la phase d'équilibre se met en place. Cette deuxième phase consiste à ce que des cellules tumorales persistent mais ne peuvent croître du fait de la surveillance immunitaire. La troisième phase, celle de l'échappement au système immunitaire se produit quand la balance entre la réponse immunitaire et les cellules tumorales devient favorable pour la croissance tumorale, du fait d'une inhibition de la réponse immunitaire ou encore de l'émergence de nouveaux variants de cellules tumorales peu sensibles à la pression immunitaire. Cette dernière phase conduit à la formation de la tumeur (Dunn, Koebel et al. 2006).

### 1.3.1) Elimination

Cette première phase reprend le concept original de l'immunosurveillance. Si elle arrive à éradiquer complètement le développement tumoral, il n'y aura donc pas la réalisation des prochaines phases. L'initiation de la réponse immunitaire anti-tumorale ne se réalise que si les cellules du système immunitaire inné arrivent à détecter la présence de cellules tumorales, ou du moins les changements du stroma occasionnés par la tumeur. Ce remodelage du stroma définit deux des six « hallmarks » du cancer décrits par Hanahan et Weinberg en 2000 : l'angiogénèse et une croissance tissulaire invasive (Hanahan and Weinberg 2000). Ce remodelage va générer la production de molécules inflammatoires et de chimiokines qui vont attirer les cellules de la réponse innée. Dans un second temps, les effets de la reconnaissance des cellules tumorales par les acteurs de la réponse innée vont être amplifiés : l'IFN-  $\gamma$  produit par les cellules NK va attirer plus de cellules immunitaires, ce qui va entraîner une production plus importante de cytokines qui vont amplifier la réponse anti-tumorale du système immunitaire inné. Au final de ces processus, une quantité importante d'antigènes tumoraux provenant des cellules tumorales mortes va être générée, permettant une activation du système immunitaire adaptatif. L'activation de ce dernier, par les DCs entre autre, constitue d'ailleurs la troisième étape de l'Elimination. La quatrième et dernière étape consiste en la mise en place du système immunitaire adaptatif. La phase d'élimination est donc un processus continu qui doit être répété à chaque nouvelle détection de cellules tumorales présentant une identité antigénique différente. C'est également pour cette raison que le cancer a une prévalence plus importante dans les populations plus âgées, où le système immunitaire commence à décliner (Dunn, Old et al. 2004).

### 1.3.2) Equilibre

Dans cette phase d'équilibre, le système immunitaire de l'hôte et les cellules tumorales ayant survécu à la phase d'élimination sont entrés dans un équilibre dynamique. Durant cette phase d'équilibre, les lymphocytes et l'IFN-  $\gamma$  exercent une pression de sélection importante, suffisante pour limiter leur prolifération, mais pas assez importante pour éliminer entièrement le pool de cellules tumorales génétiquement instables. Dans

l'article de Dunn *et al.*, cette phase est comparée à la sélection de Darwin : bien que la majorité des cellules tumorales est détruite, de nouvelles variantes de la cellule tumorale apparaissent, résistant mieux aux attaques du système immunitaire (Dunn, Old et al. 2004). A la fin de la phase d'équilibre, une nouvelle population de clones tumoraux est apparue, possédant une immunogénicité moindre que la population de cellules tumorales initiale. La phase d'équilibre est généralement la phase la plus longue, et peut durer parfois plusieurs années dans le cas de cancer chez l'humain. Le pouvoir mutant des cellules tumorales peut se caractériser en trois grands types d'instabilité génomique : instabilité de réparation à la suite d'une excision de nucléotides, instabilité des microsatellites, et instabilité chromosomiale. Cette instabilité génomique est à l'origine de l'apparition de nouvelles variantes des cellules tumorales possédant une immunogénicité réduite, leur permettant de croître dans un environnement sous contrôle par le système immunitaire. Cette phase a été expérimentalement démontrée grâce à l'utilisation de souris ayant reçu par injection sous-cutanée une petite quantité de MCA. Seules quelques souris, immunocompétentes, ont développé de petites tumeurs. Mais après déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, et après neutralisation de l'IFN-  $\gamma$ , la moitié des souris ont développé une tumeur à l'endroit de l'injection. Une déplétion des cellules de l'immunité innée n'amène pas aux mêmes résultats (Koebel, Vermi et al. 2007). MacKie *et al.* ont reporté le cas de transplantés ayant développé des mélanomes métastasés un an ou deux à la suite de transplantation d'allogreffes de reins provenant du même donneur. Il a été découvert que le donneur a été traité pour un mélanome en stade primaire seize ans auparavant, mais était considéré comme « sain » au moment de la transplantation. La suppression du système immunitaire par les traitements pharmacologiques suite aux greffes a permis un développement des cellules tumorales qui étaient en latence (MacKie, Reid et al. 2003). Ces résultats prouvent que le système immunitaire, et plus précisément l'adaptatif, permet le maintien de la phase d'équilibre (Dunn, Old et al. 2004).

### 1.3.3) Echappement

Dans cette phase, les cellules tumorales peu immunogènes, sélectionnées dans la phase d'équilibre, vont se développer et devenir visibles. Cette brèche dans les défenses du système immunitaire ne se produit généralement que lorsque les changements génétiques et épigénétiques des cellules tumorales leur confèrent une résistance à leur détection ou à leur élimination par le système immunitaire. De nombreux travaux ont récemment montré que les tumeurs pouvaient directement ou indirectement inhiber la mise en place d'une réponse anti-tumorale en induisant par exemple le relargage de cytokines immunosuppressives (comme TGF- $\beta$ , le VEGF (Vascular endothelial growth factor) et IL-10), ou encore via des mécanismes impliquant les lymphocytes T immunosuppressives, comme les LT régulatrices, qui vont mettre en place un micro-environnement immunosuppressif et induire la production de cytokines, tels que IL-4 et IL-13. Par ailleurs, ces deux dernières cytokines sont responsables de la polarisation des macrophages en macrophages de type M2, favorisant ainsi le développement tumoral. Les cellules cancéreuses peuvent également sur-exprimer des inhibiteurs de l'apoptose, tel que Bcl-XL, ou encore tuer les LT cytotoxiques en exprimant à leur surface PD-L1 (programmed cell death ligand 1) ou encore FasL.

### Conclusion sur les trois E.

Le développement des moyens expérimentaux, des modèles de souris génétiquement modifiées, l'utilisation d'anticorps monoclonaux ont permis de vérifier l'hypothèse longtemps controversée de l'immunosurveillance émise par Burnet et Thomas. Plus qu'une simple vérification, ces avancées ont permis d'établir la notion de l'« immunoediting », dans lequel il apparaît évident que la phase d'équilibre est cruciale puisqu'elle permet la mise en place d'un environnement immunosuppressif.

## 1.4) Microenvironnement tumoral immunosuppresseur.

L'inflammation est une réaction de défense du système immunitaire qui fait suite à une agression, comme par exemple une infection, une brûlure ou encore une allergie. Le mécanisme inflammatoire se déroule en deux phases, une phase vasculaire, où on va retrouver une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. La seconde phase est une phase cellulaire où on va avoir un recrutement et une infiltration des leucocytes au niveau du site inflammatoire. L'hypothèse que l'inflammation puisse jouer un rôle dans l'établissement d'une tumeur fut émise dès le 19<sup>ème</sup> siècle par Rudolf Virchow, après que ce dernier ait observé la présence de leucocytes au sein des masses tumorales. Ce n'est toutefois qu'au cours de la dernière décennie que le rôle crucial de l'inflammation dans la tumorigénèse a été clairement défini, et que certains mécanismes moléculaires ont été élucidés. Il est maintenant devenu évident que le microenvironnement inflammatoire suite à une infection bactérienne ou virale constitue un élément majeur dans l'établissement des tumeurs (de Martel and Franceschi 2009). Ainsi, il est de nos jours admis qu'une infection par les papillomavirus humains, notamment HPV16 et HPV18, est associée au cancer du col de l'utérus.

La grande majorité des cancers (90%) est liée des mutations somatiques et à des facteurs environnementaux. Les personnes souffrant d'inflammation chronique sont prédisposées à une variété de cancers, et l'inflammation constitue plus de 20% des décès mondiaux liés au cancer. Il a été montré dans certains cas que l'inflammation pouvait également diminuer les bénéfices de l'immunothérapie (Ammirante, Luo et al. 2010). Cependant, les effets de l'inflammation induite par l'immunothérapie restent controversés. En effet, elle peut avoir des effets pro-tumoraux, comme par exemple la nécrose accompagnant une croissance tumorale rapide, mais elle peut également induire une présentation croisée des antigènes tumoraux et ainsi permettre la mise en place d'une immunité anti-tumorale.

Ainsi, la composition de l'infiltrat leucocytaire change en fonction de la nature de l'inflammation: chronique ou faisant partie de l'immunosurveillance. Le microenvironnement tumoral est composé de cellules de l'immunité innée et adaptative, de médiateurs inflammatoires comme les chimiokines et les cytokines qui agissent de manière autocrine et paracrine pour contrôler la croissance tumorale. Les cellules

inflammatoires induisant un microenvironnement pro-tumoral sont les macrophages de type 2 (ou TAMs), les MDSCs (Myeloid-derived supressor cells), les neutrophiles (ou TANs) et les LT<sub>régs</sub> FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Les TAMs et les TANs ont été présentés en amont, seuls les MDSCs et les LT<sub>régs</sub> seront détaillés ci-dessous.

#### 1.4.1) Myeloid-derived supressor cells

Les MDSCs représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes, composés de macrophages immatures, de granulocytes, de cellules dendritiques et d'autres cellules myéloïdes à un stade précoce de différenciation. Les cellules myéloïdes se différencient en MDSCs grâce à des facteurs sécrétés par la tumeur, tels que Il-6, IL-10, M-CSF, GM-CSF, ou encore VEGF. Chez la souris, cette population est caractérisée phénotypiquement par un profil Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> et elle est présente dans la rate et la moelle osseuse. Les MDSCs expriment les molécules du CMH-I, mais peu ou pas de molécules du CMH-II ou de molécules de co-stimulation chez les souris atteintes de tumeur. L'activité fonctionnelle des MDSCs implique, entre autre, l'inhibition de la production de l'IFN-  $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup>. Des études récentes ont montré que les MDSCs pouvaient également induire une réponse LT tolérante, ce qui n'est pas le cas avec les cellules myéloïdes immatures. D'autre part, la sous population de MDSCs présentant le phénotype Gr-1<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> peut inhiber la prolifération des LT et induire le développement des cellules LT<sub>régs</sub>. Chez l'humain, les MDSCs sont définies comme étant un ensemble de cellules exprimant le marqueur CD33 mais présentant une absence de l'expression des marqueurs des cellules lymphoïdes et myéloïdes matures et de HLA-DR. En analogie avec les résultats trouvés chez la souris, les MDSCs isolés de patients atteints de tumeur à un stade avancé peuvent inhiber la production d'IFN-  $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup>. D'autre part, parmi ces patients, ceux présentant des métastases importantes possèdent un pourcentage de MDSCs plus important (Diaz-Montero, Salem et al. 2009) .

### 1.4.2) LT<sub>régs</sub>

#### LT<sub>régs</sub>FoxP3<sup>+</sup>

Il a été émis comme hypothèse que les tumeurs, pour induire un microenvironnement qui leur était bénéfique, favorisaient l'expansion, le recrutement et l'activation des LT<sub>régs</sub>. Les cellules T<sub>régs</sub> sont caractérisées par les marqueurs de surface CD4, CD25 (récepteurs de haute affinité à IL-2) et par le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3), qui est un marqueur intracellulaire. Elles ont été identifiées par Sakaguchi comme étant un sous-groupe des LT CD4<sup>+</sup> (elles représentent entre 5 et 10% des cellules T périphériques) qui inhibe la réponse des LT *in vivo*. Elles ont un rôle dans le maintien de l'homéostasie et de la tolérance au soi. En effet, les cellules T<sub>régs</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont impliquées dans l'inhibition d'une réponse immunitaire excessive lors d'une infection par les bactéries, les virus, une infection fongique ou encore lors d'une infection par un parasite intra-cellulaire. De plus, les LT<sub>régs</sub> participent à la mise en place d'une mémoire immunitaire des LT puisqu'en retardant la destruction du pathogène trop rapidement, ils laissent le temps aux LT mémoires de se créer. Elles sont aussi essentielles dans la réussite des transplantations de greffes, en limitant la réaction immunitaire. Les LT<sub>régs</sub> jouent un rôle important dans l'établissement de la tumeur : étant donné que beaucoup des antigènes tumoraux reconnus par les LT sont des constituants du soi en temps normal, les LT<sub>régs</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> vont induire une tolérance au soi pour empêcher la génération et l'activation des LT effecteurs, et de ce fait, empêcher l'élimination des cellules tumorales. Leur mode d'action n'est pas encore totalement connu, mais il a été démontré que les T<sub>régs</sub> FoxP3<sup>+</sup> ont la possibilité de sécréter des cytokines immunosuppressives, telles que IL-10, TGF- $\beta$  ou encore IL-35 (Collison, Pillai et al. 2009). De plus, il semblerait que les LT<sub>régs</sub> exercent un rôle suppresseur vis à vis des DCs et des LT effecteurs grâce à l'expression de CTLA-4 à leur surface, qui va être reconnue par la cellule présentatrice d'antigène *via* les molécules de co-stimulation CD-80 ou CD-86. Des données cliniques ont montré qu'un plus grand nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> étaient retrouvées circulantes, ou au sein même de la tumeur chez les patients atteints de cancer du poumon, du pancréas, des seins, des ovaires ou encore de la peau. Dans les travaux publiés par Curiel *et al.*, il a été montré que le grand nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> retrouvées dans les tumeurs était inversement corrélé avec

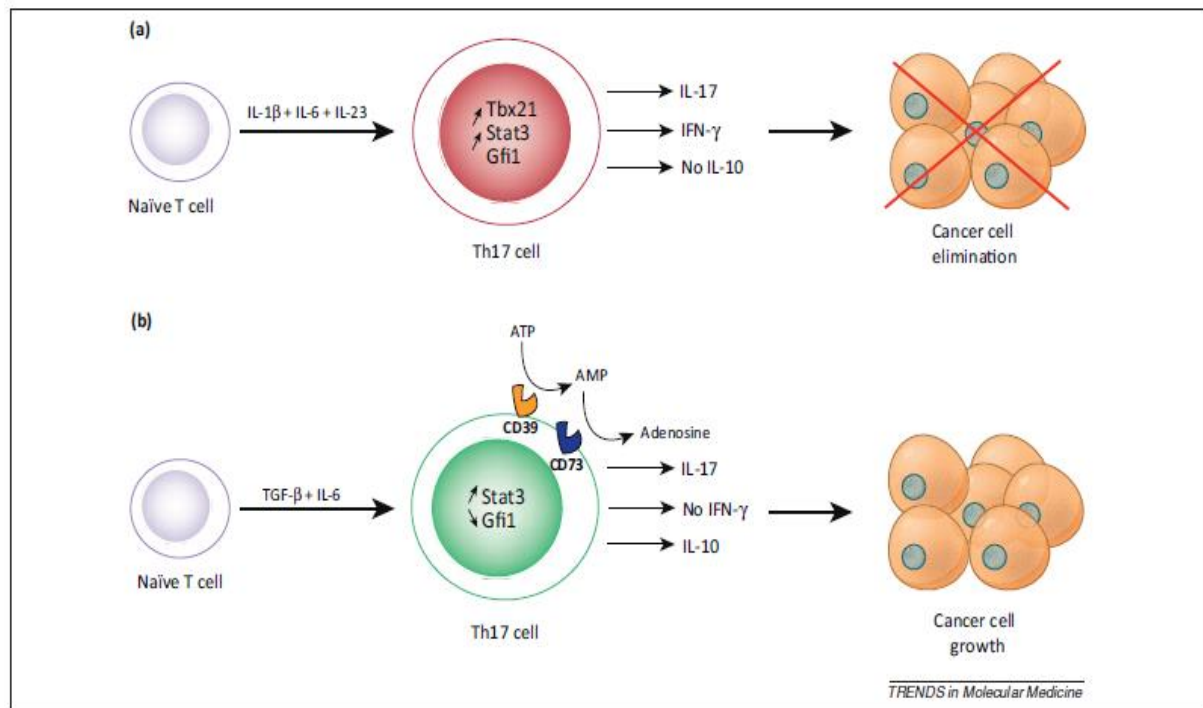


la survie des patientes atteintes de carcinomes ovariens (Curiel, Coukos et al. 2004). Cependant, le rôle des  $T_{reg}$  reste à être éclairci. En effet, il a été montré qu'un nombre élevé de  $T_{reg}$  intratumoraux était associé à une survie globale plus longue chez les patients atteints de lymphomes folliculaires et de lymphomes de Hodgkin (Alvaro, Lejeune et al. 2005, Carreras, Lopez-Guillermo et al. 2006). Cette corrélation entre le nombre de  $T_{reg}$  et le pronostic positif a été récemment étendue aux tumeurs solides. Badoual *et al* ont montré que chez des patients atteints de cancers de la tête et de la nuque, l'infiltration tumorale par les cellules  $T_{reg}$  FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> était associée à un meilleur contrôle local de la tumeur (Badoual, Hans et al. 2006). Ces résultats contradictoires pourraient tout d'abord être expliqués par le stade dans lequel se trouve la tumeur : la population de cellules  $T_{reg}$ FOXP3<sup>+</sup> n'induirait un environnement pro-tumoral que dans le cas de tumeurs se trouvant à un stade précoce. En effet, bien qu'étant généralement associé à un mauvais pronostic dans le cas des cancers ovariens, il a été observé que l'infiltration tumorale par les  $T_{reg}$ FOXP3<sup>+</sup> ne permettait cependant pas de donner un pronostic sur la survie du patient dans le cas de cancer ovarien à un stade avancé ou métastasé (Leffers, Gooden et al. 2009). Contrairement, chez la souris, FOXP3 peut être transitoirement exprimée par certaines populations de cellules. Ainsi, les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> expriment transitoirement FOXP3 sans pour autant acquérir des fonctions suppressives (Walker, Kaspruwicz et al. 2003). Par conséquent, même si FOXP3 reste actuellement le meilleur marqueur des  $T_{reg}$ , sa seule utilisation en immunohistochimie pourrait surestimer la population de  $T_{reg}$  (Badoual, Hans et al. 2009).

### LT TH17

En 1986, Mosmann *et al.*, ont décrit deux sous-populations distinctes de cellules T CD4<sup>+</sup> helper (Th) caractérisées par des sécrétions de cytokines bien différentes : la sous-population Th1 est caractérisée par une sécrétion d'IFN-  $\gamma$  alors que la sous-population Th2 sécrète une variété de facteurs solubles, comme par exemple IL-4, IL-5 et IL-13 (Mosmann, Cherwinski et al. 1986). Les auteurs ont également émis l'hypothèse qu'il existait une sous-population de cellules Th supplémentaire qui serait essentielle pour contrôler la réponse immunitaire. La sous-population Th17 a été découverte, bien différente de Th1 et Th2, caractérisée par une production de l'IL-17, IL-22 et IL-23. Cette

dernière cytokine est par ailleurs nécessaire, au même titre qu'IL-1, pour une différenciation totale et fonctionnelle et à la fonction des cellules Th17. L'IL-17 est la cytokine effectrice qui constitue la signature de la sous-population des Th17. Elle est produite à un niveau local et agit sur les cellules du stroma, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et ainsi que sur une sous-population de monocytes pour sécréter des facteurs pro-inflammatoires tels que IL-8, TNF, CXCL1, et G-CSF, qui vont promouvoir un recrutement rapide des neutrophiles (Kastelein, Hunter et al. 2007). Le rôle des Th17 dans la réponse immunitaire anti-tumorale reste encore controversé. En effet, il a été décrit que les Th17 possèdent la capacité d'induire l'angiogénèse et d'activer des facteurs pro-tumoraux, mais qu'ils peuvent également induire la sécrétion de CXCL9 et CXCL10, ce qui va attirer les LT effectrices au niveau de la tumeur (**fig 6**, (Hinrichs, Kaiser et al. 2009, Kryczek, Banerjee et al. 2009)). Ainsi l'infiltration tumorale par les lymphocytes Th17 est associée à un mauvais pronostic dans le cas de cancers colorectaux, de cancers des poumons et de carcinomes hépatocellulaires, mais est associé à un bon pronostic de la survie du patient dans le cas de cancers de l'œsophage et de cancers gastriques (Chen, Wan et al. 2010, Chen, Xia et al. 2011, Liu, Duan et al. 2011, Lv, Pan et al. 2011).



**Fig. 6 Effets des cellules T helper sur la croissance tumorale.** a) Les cellules différenciées en Th17 en absence de TGF- $\beta$  expriment le facteur de transcription Tbx21 pour Th1, et sécrètent l'IFN- $\gamma$  mais pas IL-10. Ces cellules vont induire l'activation des cellules T CD8 $^{+}$  effectives et une régression de la tumeur de façon IL-17 et IFN- $\gamma$  dépendante. b) Les cellules Th17 générées en présence de TGF- $\beta$  échouent à produire de l'INF- $\gamma$  mais sécrètent de l'IL-10. Elles vont également diminuer l'expression de Gfi1, qui a pour rôle de convertir l'ATP en adénosine, et contribuent ainsi à l'inhibition de l'immunité anti-cancéreuse. (Segal-Bendirdjian, Dudognon et al. 2005)

## Conclusion Partie I

La complexité du microenvironnement tumoral fait intervenir plusieurs types cellulaires. Chaque type cellulaire peut avoir plusieurs rôles, souvent contradictoires, selon le contexte, les interactions avec les autres types cellulaires et les cytokines sécrétées. Ainsi, chaque type cellulaire peut aussi bien avoir des effets anti-tumoraux que pro-tumoraux, comme le montre le **tableau 1**.

Table 1. Roles of Different Subtypes of Immune and Inflammatory Cells in Antitumor Immunity and Tumor-Promoting Inflammation		
Cell Types	Antitumor	Tumor-Promoting
Macrophages, dendritic cells, myeloid-derived suppressor cells	Antigen presentation; production of cytokines (IL-12 and type I IFN)	Immunosuppression; production of cytokines, chemokines, proteases, growth factors, and angiogenic factors
Mast cells		Production of cytokines
B cells	Production of tumor-specific antibodies?	Production of cytokines and antibodies; activation of mast cells; immunosuppression
CD8 <sup>+</sup> T cells	Direct lysis of cancer cells; production of cytotoxic cytokines	Production of cytokines?
CD4 <sup>+</sup> Th2 cells		Education of macrophages; production of cytokines; B cell activation
CD4 <sup>+</sup> Th1 cells	Help to cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in tumor rejection; production of cytokines (IFN $\gamma$ )	Production of cytokines
CD4 <sup>+</sup> Th17 cells	Activation of CTLs	Production of cytokines
CD4 <sup>+</sup> Treg cells	Suppression of inflammation (cytokines and other suppressive mechanisms)	Immunosuppression; production of cytokines
Natural killer cells	Direct cytotoxicity toward cancer cells; production of cytotoxic cytokines	
Natural killer T cells	Direct cytotoxicity toward cancer cells; production of cytotoxic cytokines	
Neutrophils	Direct cytotoxicity; regulation of CTL responses	Production of cytokines, proteases, and ROS

**Tab. 1** Tableau récapitulatif des effets anti-tumoraux et pro-tumoraux des différentes sous-populations cellulaire du système immunitaire. (Grivennikov, Greten et al. 2010)

## **PARTIE II**

### **2) Mort et survie cellulaire**

Les premières descriptions des mécanismes de mort cellulaire remontent aux années 1960. Depuis, plusieurs moyens de classification ont été proposés. Le comité de nomenclature de la mort cellulaire (Nomenclature Committee on Cell Death), qui regroupe des chercheurs experts dans le domaine, a proposé en 2005 et 2009 des critères morphologiques pour définir les différents types de mort cellulaire (Kroemer, El-Deiry et al. 2005, Kroemer, Galluzzi et al. 2009). En 2012, une nouvelle classification des différentes morts cellulaires est proposée, incluant les caractéristiques biochimiques aux caractéristiques morphologiques (Galluzzi, Vitale et al. 2012). Une cellule mourante est engagée dans un ensemble de processus réversibles, jusqu'à ce qu'un des « points de non-retour » est atteint : cela peut être une activation massive des caspases, une perte du potentiel de membrane, une perméabilisation complète de la membrane externe mitochondriale ou alors une exposition à la surface cellulaire de phosphatidylsérines qui agiront comme un signal « eat me ». Trois principaux types de mort cellulaire ont été décrits : l'apoptose, la nécrose et l'autophagie (Festjens, Vanden Berghe et al. 2006). De manière simpliste, l'apoptose (ou mort cellulaire programmée) a été caractérisée comme étant la mort cellulaire silencieuse, car la dégradation des cellules en apoptose par les cellules phagocytaires a longtemps été décrite comme ne permettant pas d'induire une réponse immunitaire. Il a été récemment démontré que bien qu'une mort par apoptose était le plus souvent considérée comme non-immunogénique, certains stimuli pouvaient amener à une prise en charge des cellules apoptotiques par les cellules dendritiques, suivi d'une présentation antigénique et d'une réponse immunitaire spécifique (Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007, Obeid, Tesniere et al. 2007, Ghiringhelli, Apetoh et al. 2009, Kroemer, Galluzzi et al. 2009). La nécrose, ou mort cellulaire nécrotique, a longtemps été considérée comme une mort cellulaire accidentelle et non contrôlée. Ses caractéristiques morphologiques ont été décrites comme étant : un gain du volume cellulaire, un gonflement des organelles, la rupture de la membrane plasmique et une fuite du contenu cellulaire (Kroemer, Galluzzi et al. 2009). Il a récemment été démontré que la mort cellulaire nécrotique pouvait être régulée par un ensemble de voies de transduction et de mécanismes cataboliques. Ainsi, certains

récepteurs de domaine de mort, tels que Fas/CD95 ou TRAIL-R, et certains récepteurs Toll-like, comme TLR3 et TLR4, peuvent induire une mort nécrotique. De plus, il a été observé dans certains modèles, comme le modèle des cellules interdigitales des ébauches membranaires de souris, qu'une inhibition de caspases, soit par une absence de l'activateur essentiel de caspases Apaf-1, soit *in vitro* avec l'ajout de l'inhibiteur de caspases à large spectre Z-VAD-fmk, suffit pour rediriger une mort cellulaire apoptotique vers une mort cellulaire nécrotique (Chautan, Chazal et al. 1999). La nécrose serait donc, dans ce cas, une solution en cas d'échec de l'apoptose.

En fonction du contexte, la nécrose peut donc être complètement accidentelle, non contrôlée, ou alors au contraire « programmée » (Golstein and Kroemer 2007).

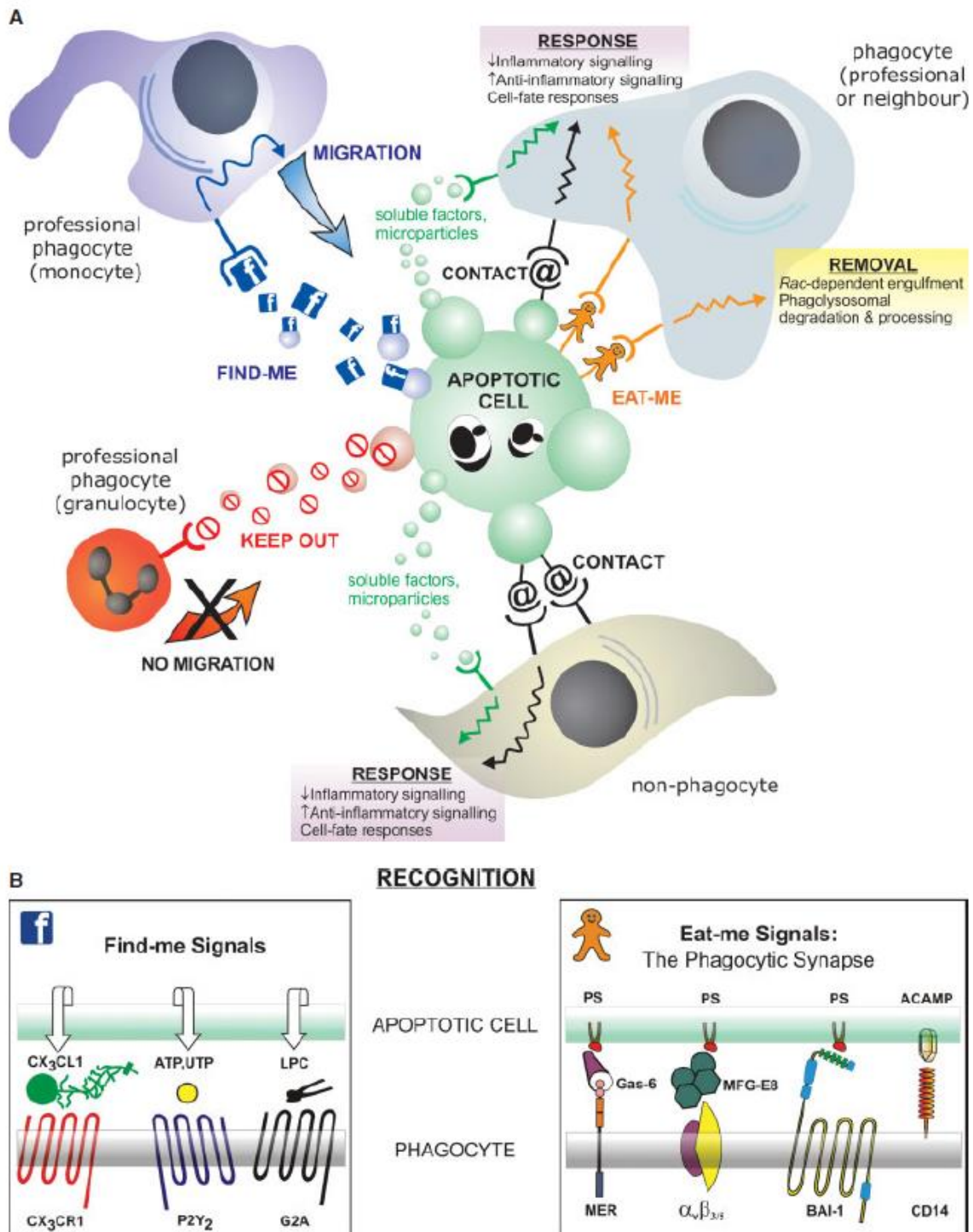
Dans le cas d'une mort cellulaire nécrotique, le contenu cellulaire est libéré dans le milieu extracellulaire, ce qui agit comme un signal de danger. De ce fait, la nécrose est généralement associée à l'inflammation. Cependant, il a été montré que la présence de cellules nécrotiques n'était pas suffisant pour induire une activation des macrophages ni une expression de cytokines proinflammatoires (Brouckaert, Kalai et al. 2004). La macroautophagie, ou plus communément appelée l'autophagie, est un mécanisme de survie cellulaire. Elle est caractérisée par une absence de condensation de la chromatine, mais avec une vacuolisation importante du cytoplasme. Cependant, dans certains cas, l'autophagie peut mener à une atrophie prolongée du cytoplasme, et ainsi à la mort de la cellule. La mort autophagique est peu ou pas du tout liée aux phagocytes. Le type de mort cellulaire choisi dépend du stimulus et de l'environnement cellulaire car chaque programme de mort cellulaire est le résultat de signaux promouvant une mort particulière tout en réprimant les autres programmes de mort cellulaire (Leist, Single et al. 1997, Degenhardt, Mathew et al. 2006).

Il existe également des morts cellulaires atypiques. C'est le cas de la catastrophe mitotique, qui décrit une mort cellulaire faisant suite à une dérégulation lors de la mitose, pouvant être accompagnée d'altérations morphologiques, tels que la micronucléation ou la multinucléation.

L'apoptose et l'autophagie sont les deux mécanismes de mort cellulaire les plus étudiés durant ma thèse. Ces deux voies vont donc être expliquées plus en détails.

## 2.1) Apoptose

Le mot « apoptose » a été utilisé pour la première fois en 1972 par Kerr *et al.*, pour décrire une mort cellulaire avec une morphologie particulière. L'apoptose est caractérisée par un arrondissement de la cellule, une diminution du volume cellulaire, une rétraction des pseudopodes, une condensation de la chromatine ainsi qu'une fragmentation du noyau et un bourgeonnement de la cellule tout en maintenant intacte la membrane plasmique, ce qui va aboutir à la formation de corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques seront par la suite ingérés par les cellules phagocytaires voisines (Kerr, Wyllie et al. 1972). Jusqu'à récemment, les cellules apoptotiques étaient considérées comme étant relativement peu immunogéniques. Cependant, de récents travaux ont montré que les cellules apoptotiques pouvaient également sécréter des facteurs solubles, agissant comme des signaux de chimiotaxie (Gregory and Pound 2011). Les étapes dynamiques de la prise en charge des cellules apoptotiques ont été définies par les '3Rs' : « *recognition, response et removal* » (*reconnaissance, réponse et suppression*) (Gregory and Pound 2010). La phase de reconnaissance est rendue possible grâce à la réponse migratoire des phagocytes mononucléaires aux chimioattractants libérés par les cellules apoptotiques (**fig 7**). Parmi ces chimioattractants, nous retrouvons le signal lipidique lysophosphatidylcholine (LPC) (Lauber, Bohn et al. 2003), l'ATP et UTP (Elliott, Cheken et al. 2009), ainsi que la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) (Kobara, Sunagawa et al. 2008). D'autre part, il y a également des changements dans la composition et la topologie moléculaire de la membrane plasmique d'une cellule apoptotique. L'exposition du signal « eat me » le plus connu est la redistribution de la phosphatidylsérine (PS), qui, chez les cellules vivantes, est confinée dans la membrane interne de la membrane plasmique (Fadok, Voelker et al. 1992).



**Fig. 7 Reconnaissance, réponse et élimination de la cellule apoptotique.** Les cellules apoptotiques interagissent avec leur environnement *via* de nombreux mécanismes. A) Les réponses cellulaires de l'apoptose incluent l'action de cellules phagocytiques et non-phagocytiques, activées par des facteurs solubles ou des microparticules agissant comme des signaux « find me », « keep-out » ou encore « eat me ». B) Exemples de protagonistes moléculaires impliqués dans la chimiotaxie et l'élimination des cellules apoptotiques (Gregory and Pound 2011).

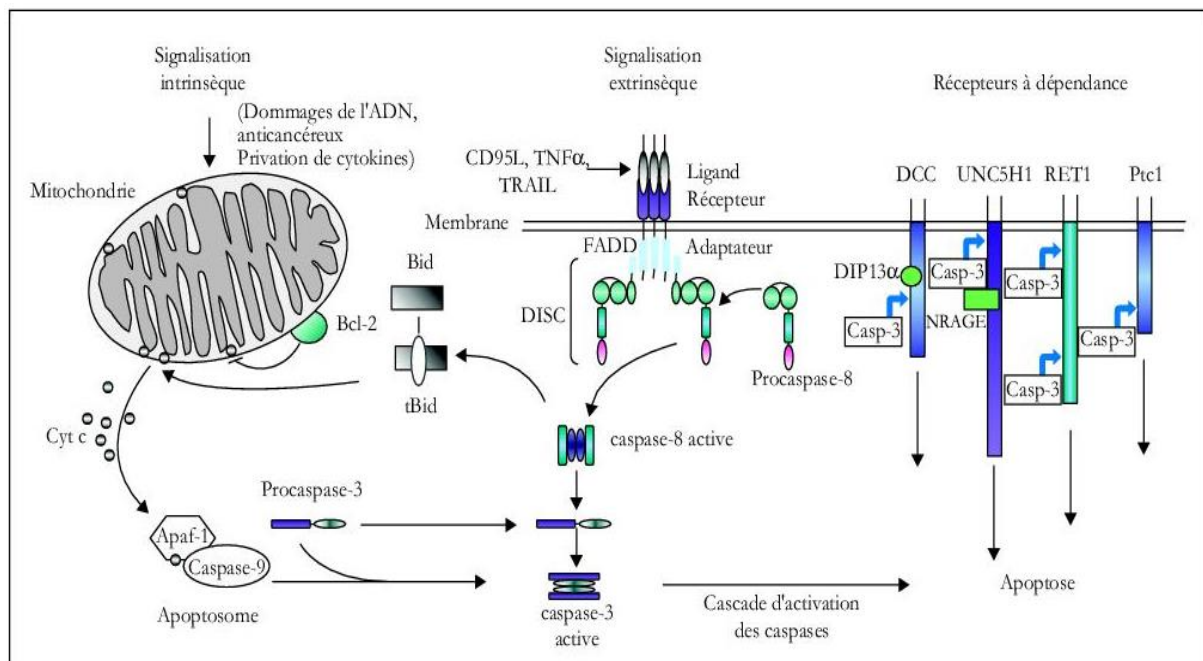


Il existe différents sous-types d'apoptose qui, bien que morphologiquement semblables, empruntent des chemins biochimiques différents. On distingue donc la voie extrinsèque de l'apoptose, activée par des signaux de stress extracellulaires transmis par les récepteurs transmembranaires spécifiques, et la voie intrinsèque, ou mitochondriale, qui est activée par des signaux intracellulaires (Riedl and Salvesen 2007).

La voie extrinsèque de l'apoptose peut être initiée par des liaisons de ligand à leurs récepteurs de mort, tels que FasL/CD95L à FAS/CD95, TNF $\alpha$  à TNFR1, TRAIL à TRAIL-R (Strasser, Jost et al. 2009). Cela va aboutir au recrutement de la molécule adaptatrice FADD (Fas-associated death domain-containing protein) qui va se lier à la pro-caspase-8 et au complexe DISC (Death-inducing signaling complex). La formation de ce complexe entraîne trois cascades majeures de signalisation menant à l'apoptose : 1) le clivage et l'activation de la caspase-8 va cliver à son tour les caspase-3, 6 ou 7 ; 2) le clivage et l'activation de la caspase-8, qui va cliver BID (BH3-interacting domain death agonist) et ainsi générer tBID, qui va activer la caspase-9, qui à son tour va activer les caspases-3, 6 ou 7 ou alors 3) une activation directement de la caspase-9 qui va activer les caspases 3, 6 ou 7. Ceci va amener à la fragmentation de l'ADN et à la condensation de la chromatine. La voie intrinsèque de l'apoptose peut être induite par une multitude de conditions de stress intracellulaire, comme un dommage de l'ADN, un stress du réticulum endoplasmique, un excès en Ca<sup>2+</sup> cytosolique. Ceci va amener à une perméabilisation des mitochondries (Kroemer, Galluzzi et al. 2007). Suite à cette perméabilisation, on va avoir une libération de molécules pro-apoptotiques, normalement contenues dans l'espace inter-membranaire, telles que le Cytochrome *c* (Cyt *c*) (Kluck, Bossy-Wetzel et al. 1997), l'Apoptosis Inducing Factor (AIF) et second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with a low pI (Smac/DIABLO). Le Cyt *c* va ensuite s'associer avec la procaspase 9 et APAF-1 (apoptosis protease activating factor 1) pour former le complexe multi-protéique apoptosome (Cain, Bratton et al. 2002, Hill, Adrain et al. 2004). Ce complexe va cliver la procaspase 9 en caspase 9, qui va activer les caspases effectrices de l'apoptose. AIF est impliquée dans la voie indépendante des caspases : il est transloqué dans le noyau avec l'endonucléase G et vont provoquer la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine. La famille des protéines homologues à Bcl-2 joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose. En effet, la sous famille Bcl-2 est anti-apoptotique et elle est capable de bloquer la sortie du Cyt *c*, et ainsi empêcher la formation du complexe multi-protéique apoptosome. En revanche, la sous-

famille BAX, comprenant BAX et BAK, est pro-apoptotique. Les protéines pro-apoptotiques présentent la région d'homologie BH3, qui va leur permettre de se lier aux protéines de survie après un signal de stress et ainsi empêcher ces dernières d'exercer leur action anti-apoptotique. Les protéines telles que BAX vont alors être transférées à la membrane externe de la mitochondrie, perturber son intégrité et permettre la libération du Cyt *c* menant à l'apoptose. Il existe un lien entre la voie extrinsèque de l'apoptose et la voie intrinsèque, mettant en jeu la protéine BID. En effet, la caspase 8, une fois activée, va cliver BID en tBID (truncated BID). tBID va ensuite induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (**Fig. 8**, (Garrido and Kroemer 2004, Kroemer, Galluzzi et al. 2007)).

Les connaissances sur ces différentes voies de l'apoptose ont permis de mieux lutter contre la résistance des cancers aux chimiothérapies et de restaurer l'apoptose des cellules cancéreuses.



**Fig. 8 Voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.** La voie intrinsèque de l'apoptose résulte de la perforation de la membrane mitochondriale, conduisant au relargage de protéines, telles que le cytochrome *c*. Ceci va induire la formation de l'apoptosome, activant les caspases menant à l'apoptose. La voie extrinsèque résulte de l'activation et de l'oligomérisation des récepteurs de mort, déclenchant la cascade d'activation des caspases et menant à l'apoptose. (Segal-Bendirdjian, Dudognon et al. 2005)

## 2.2) Autophagie

La macroautophagie, plus communément appelée l'autophagie, est la séquestration du matériel cytoplasmique au sein des autophagosomes, et qui sera dégradé par la suite par les lysosomes. Les autophagosomes sont des vésicules à double membrane contenant des organelles cytosoliques dégénératifs ou du cytosol, bien distinctes des autres types de vésicules, telles que les endosomes, lysosomes ou encore des corps apoptotiques. La fusion des autophagosomes et des lysosomes forme un autolysosome, dans lequel sera dégradé le contenu des autophagosomes grâce aux hydrolases acides des lysosomes. Cette voie présente un avantage sur celle du protéasome : la possibilité de dégrader de très grosses protéines. L'autophagie est divisée en différentes phases contrôlées par les protéines de la famille « Atg ». Le **tableau 2** récapitule les rôles des principales protéines intervenant dans l'autophagie.

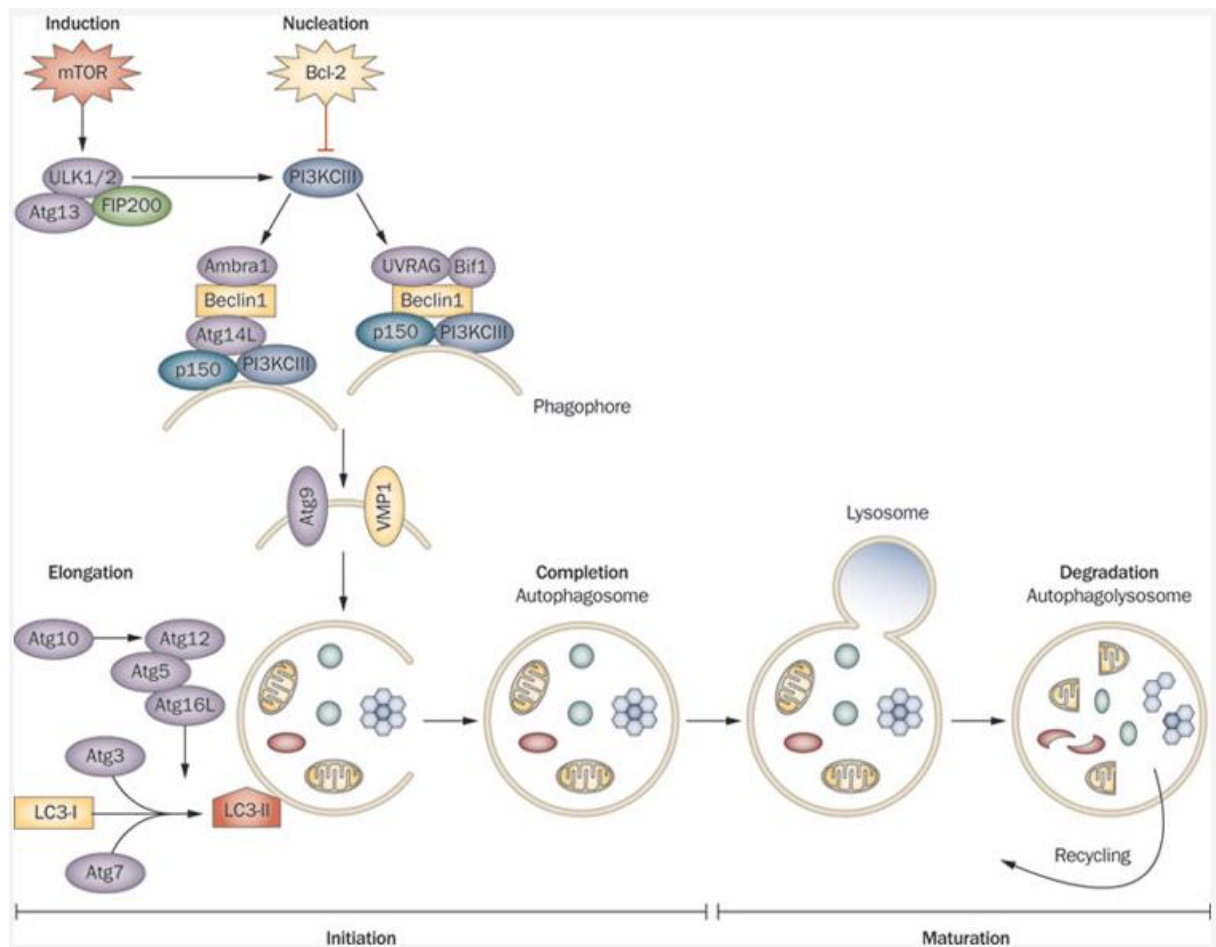
Table 1   Major autophagy proteins			
Protein	Autophagy step	Feature of Atg protein	Complex or interaction
ULK1/2 (Atg1)	Induction	Serine–threonine kinase that functions in recruitment and release of other Atg proteins from the PAS	ULK1/2–Atg13–FIP200
Atg2	Nucleation	Protein that acts with Atg18 to mediate retrograde movement of Atg9 from the PAS	Atg2–Atg18
Atg3	Elongation	Ubiquitin conjugating enzyme (E2) analog that conjugates LC3 to PE after activation by Atg7	Atg3–Atg7–LC3
Atg4	Elongation	Cysteine protease that cleaves the C-terminus of LC3 to expose a glycine residue for conjugation. It also removes PE from LC3	LC3
Atg5	Elongation	Protein containing ubiquitin folds, which acts in a part as E3 ligase for LC3–PE conjugation	Atg12–Atg5–Atg16L
Beclin1 (Atg6)	Nucleation	Part of PI3KCIII complex involved in autophagy activation	Atg14L–Beclin1–PI3KCIII–p150; UVRAG–Beclin1–PI3KCIII–p150
Atg7	Elongation	Ubiquitin activating (E1) enzyme homolog that activates LC3	Atg3–Atg7–LC3
LC3 (Atg8)	Elongation	Ubiquitin-like protein conjugated to PE; it is involved in cargo recruitment and autophagosome formation	Atg3–Atg7–LC3; Atg12–Atg5–Atg16L; Atg4
Atg9	Nucleation	Transmembrane protein involved in phagophore expansion	ULK1, PI3KCIII, Atg2, Atg18
Atg10	Elongation	Ubiquitin conjugating (E2) enzyme analog that conjugates Atg12 to Atg5	Atg12–Atg5–Atg16L
Atg11	Elongation	Scaffold protein acting in selective autophagy (mitophagy, pexophagy). It binds to Atg19, PpAtg30, and Atg32 in a specific cargo recognition process	Atg19
Atg12	Elongation	Ubiquitin-like protein that conjugates to Atg5	Atg12–Atg5–Atg16L
Atg13	Induction	Component of the Atg1 complex needed for Atg1 kinase activity	ULK1/2–Atg13–FIP200
Atg14L (Atg14)	Nucleation	Component of the PI3KCIII complex	Atg14L–Beclin1–PI3KCIII–p150
Atg16L (Atg16)	Elongation	Component of the Atg12–Atg5–Atg16L	Atg12–Atg5–Atg16L
FIP200 (Atg17)	Induction	Component of ULK1/2 complex modulating magnitude of autophagic response	ULK1/2–Atg13–FIP200
Atg18	Nucleation	Protein that acts with Atg2 to mediate retrograde movement of Atg9 from the PAS	Atg2–Atg18
Atg19	Nucleation	Receptor recruiting cargo in selective autophagy	Atg11
Atg20	Induction	Phosphatidylinositol 3-phosphate-binding protein	ULK1/2–Atg13–FIP200

Abbreviations: Atg, autophagy-related gene; PAS, phagophore assembly site; PE, phosphatidylethanolamine; PI3KCIII, phosphoinositide 3-kinase class III.

**Tab. 2 Rôle des principales protéines impliquées dans l'autophagie (Janku, McConkey et al. 2011)**

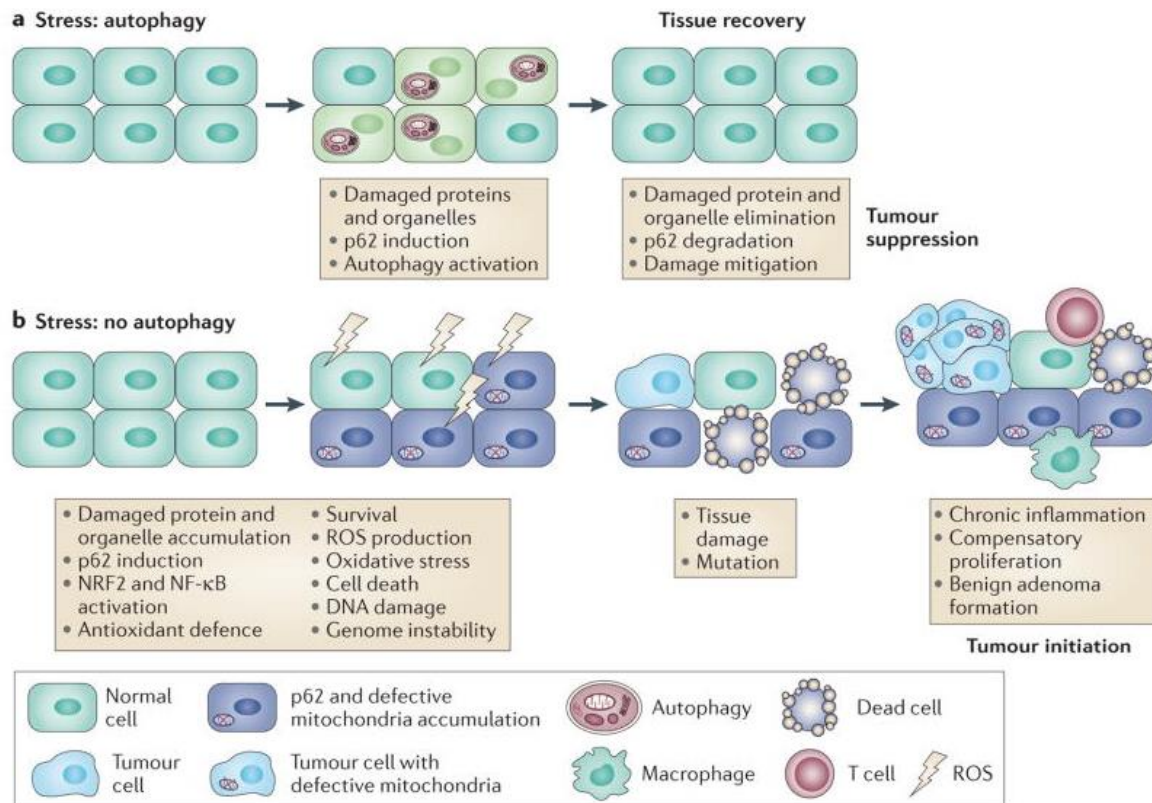
La phase initiale, appelée nucléation, est caractérisée par la formation des autophagosomes aux sites d'assemblage PAS (phagophore assembly site), composés de phagophores en formation et de protéines autophagiques. Cette phase est caractérisée par l'isolement d'une double membrane, appelée autophagophore (ou phagophore), qui va envelopper le cargo autophagique. Cette membrane peut être dérivée du réticulum endoplasmique, de la membrane mitochondriale externe ou encore de la membrane plasmique. L'étape suivante, appelée élongation du phagophore, implique l'action de Atg 3, Atg 5, Atg 7, qui vont convertir LC3-I (microtubule-associated protein light chain 3) en LC3-II, qui est la forme associée à l'autophagosome. Atg 10, Atg 12 et Atg 16L achèvent la

formation de l'autophagosome et permettent l'encapsulation complète du cargo cytosolique (**fig 9**).



**Fig. 9 Voie de signalisation de l'autophagie** L'autophagie est sous le contrôle des protéines Atg, dont Atg9 et également VMP1, qui sont des facteurs essentiels pour l'autophagie. La forme lipidique de LC3 est attachée à la membrane de l'autophagosome, qui séquestre le cargo autophagique. Lors de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, donnant ainsi un autophagolysosome, le cargo autophagique est lysé et dégradé. (Janku, McConkey et al. 2011)

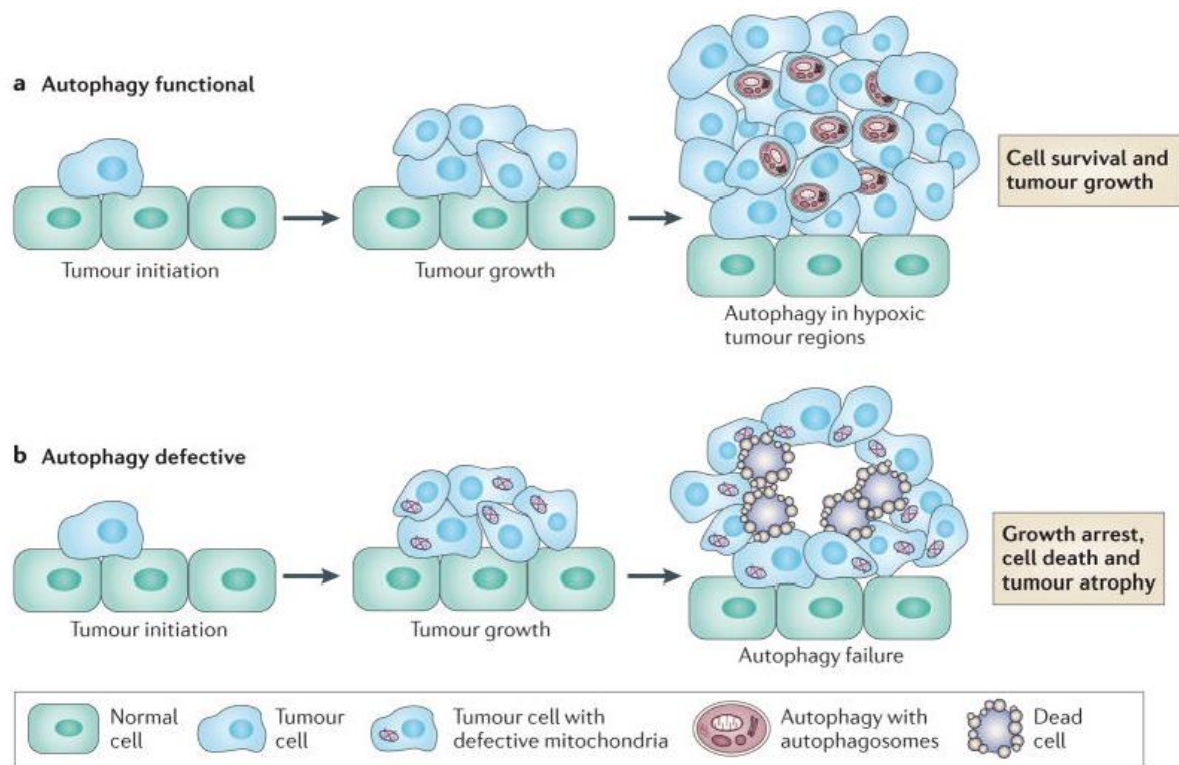
L'autophagie peut être stimulée en cas de stress, comme une carence en nutriments, l'absence en facteurs de croissance ou encore l'hypoxie. Dans les conditions physiologiques, l'autophagie permet le maintien de l'homéostasie en assurant l'élimination et le remplacement continu des protéines et des organites non fonctionnels. Elle constitue une stratégie de survie en induisant une survie des cellules indépendamment des facteurs de croissance, et ce, jusqu'à plusieurs semaines (**fig. 10**, (Lum, Bauer et al. 2005, White 2012)).



**Fig. 10 Mécanismes de suppression de tumeur via l'autophagie.** a) Que ce soit dans des conditions physiologiques ou dans des conditions de stress, l'autophagie permet d'éviter l'accumulation de protéines oncogéniques, telles de p62, ainsi que de protéines et d'organelles endommagés. b) Dans les tissus déficients pour l'autophagie, il y a une accumulation de p62 et de protéines endommagées, ainsi qu'une activation des voies de signalisation oncogéniques. Ceci amène à la production de ROS (Reactive Oxygen Species), à des dommages chroniques des tissus, à une inflammation et à une instabilité génomique. Tout ceci va constituer un environnement favorable au développement tumoral (White 2012).

Cependant, l'autophagie est une méthode de survie qui a ses limites, car un état d'autophagie prolongé de la cellule amène à la mort de celle-ci. Il a été montré dans diverses études qu'une inhibition de l'autophagie amenait à une inhibition partielle de la mort cellulaire (**fig. 11**).





**Fig. 11 Rôle pro-angiogénique de l'autophagie.** a) L'autophagie est surexprimée dans certains cancers, induisant la formation de régions tumorales en hypoxie, permettant ainsi la survie des cellules tumorales. b) Les cellules tumorales déficientes pour l'autophagie accumulent des mitochondries défectueuses et induisent ainsi la mort cellulaire dans les régions en hypoxie, et l'atrophie de la tumeur (White 2012).

Cependant, la mort par autophagie reste très controversée. C'est ainsi que Galluzzi *et al.*, ont proposé de définir la mort cellulaire par autophagie toutes celles dont les caractéristiques de l'autophagie peuvent être bloquées par les inhibiteurs chimiques ou inhibitions génétiques (knockout de gènes ou utilisation de siRNA ciblant les gènes essentiels tels que ATG-5, ou encore Beclin-1). Les morts cellulaires présentant des marqueurs de l'autophagie, telle que la lipidation de LC3, mais ne pouvant pas être bloquées par l'inhibition de l'autophagie, ne devraient donc pas être qualifiées comme mort cellulaire par autophagie (Galluzzi, Vitale et al. 2012).

Plusieurs études ont montré que l'autophagie pouvait être induite par un stress du réticulum endoplasmique (ER). La voie UPR (unfolded protein response) permet de détecter les protéines mal repliées dans la lumière du ER grâce à : PERK (protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase), IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) et ATF6 (activating factor transcription factor 6). L'activation de PERK permet la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  du facteur eIF2 $\alpha$ , ce qui va inhiber l'assemblage du ribosome 80S et de ce fait, inhiber la synthèse protéique. L'activation de IRE1 et d'ATF6

permettent la transcription des gènes cibles de la voie UPR, comme par exemple l'activation de XBP1, qui va à son tour activer la transcription de protéines chaperonnes du ER (Ogata, Hino et al. 2006).

L'autophagie joue donc un double rôle dans le cas des cellules cancéreuses : elle permet à la cellule cancéreuse de se maintenir en vie grâce à sa fonction de recyclage des organelles endommagées et des protéines mal repliées, mais dans des conditions de stress, elle permet à la cellule saine d'assurer une stabilité génétique. Lorsqu'une cellule est déficiente en autophagie, on peut trouver une accumulation de dommages de l'ADN, amenant à une instabilité génétique, provoquer une inflammation chronique pouvant amener à une formation de tumeur.

## **Conclusion Partie II**

L'apoptose et l'autophagie se révèlent deux cibles prioritaires dans la recherche anti-cancéreuse. A partir de ces données, notre laboratoire a ciblé ses recherches sur le rôle majeur de l'apoptose et de l'autophagie dans les cellules cancéreuses lors d'une chimiothérapie. Nous avons ainsi démontré que certaines chimiothérapies permettaient d'induire une mort immunogène, caractérisée par différents signaux précis qui seront détaillés ci-après.



## PARTIE III

### 3) La Mort Cellulaire Immunogène

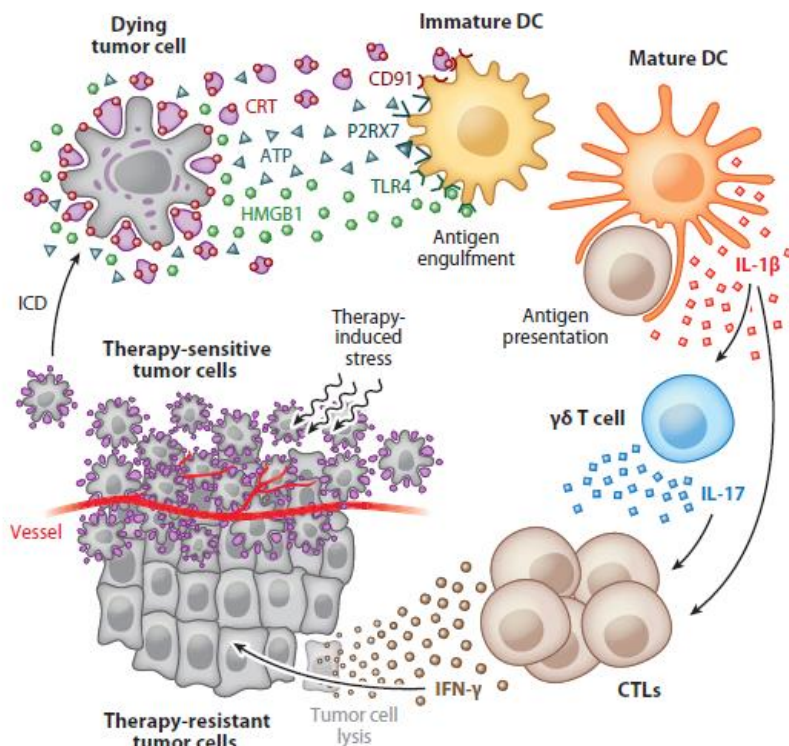
Le succès total d'une chimiothérapie repose sur le fait qu'elle cible les cellules tumorales et permette l'éradication à long terme de celles-ci. Malheureusement, les effets cytotoxiques des chimiothérapies n'affectent pas seulement les cellules tumorales, mais également les cellules du système immunitaire. Elles sont donc communément accompagnées d'une immunosuppression. D'autre part, les chimiothérapies induisent majoritairement l'apoptose des cellules, connue pour être une mort cellulaire silencieuse, ou même dans certains cas, tolérogénique. Le rôle du système immunitaire dans les thérapies anticancéreuses a donc été trop longtemps négligé. Ceci pose un problème quant à la survie du patient, car quand bien même l'acte chirurgical se révèle être un succès, le patient n'aura pas la surveillance d'un système immunitaire lui permettant d'éviter d'éventuelles rechutes (Casares, Pequignot et al. 2005, Krysko, Garg et al. 2012). Ce ne fut que récemment qu'a émergé la notion de la mort cellulaire immunogène, suggérant un rôle important du système immunitaire dans le succès des chimiothérapies. En effet, certaines chimiothérapies, comme les anthracyclines ou l'oxaliplatine, ou encore les radiothérapies ont la capacité d'induire une mort cellulaire immunogène.

Casares et *al.* ont démontré en 2005 que des cellules tumorales mourantes traitées au préalable *in vitro* par des anthracyclines, dans ce cas par la doxorubicine, pouvaient induire une réponse immunitaire spécifique une fois injectées dans des souris syngéniques puisqu'une seconde injection de cellules tumorales vivantes échoue à induire l'apparition de tumeur chez ces mêmes souris (Casares, Pequignot et al. 2005). Outre la doxorubicine, la mitoxantrone fait également partie des anthracyclines capables d'induire une mort cellulaire immunogène, ainsi que l'oxaliplatine, qui est un dérivé de sel de platine. Ces différents composés agissent en tant qu'agents intercalants de l'ADN et sont utilisés depuis des dizaines d'années en clinique.

L'utilisation de souris immunocompétentes (C57Bl/6 ou Balb/c) versus immunodéficientes (nu/nu) a permis de mettre en évidence l'implication du système immunitaire dans la mise en place d'une réponse anti-tumorale, puisque contrairement

aux souris immunocompétentes, les souris nude échouent à reconnaître les antigènes tumoraux et on observe l'apparition de tumeurs chez ces souris lors de la seconde injection de cellules tumorales. Ces études ont également permis de montrer que la mise en place de la réponse immunitaire anti-tumorale était dépendante des lymphocytes T (Casares, Pequignot et al. 2005, Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007). D'autre part, un traitement concomitant des cellules tumorales par les anthracyclines et par le Z-VAD-fmk, qui est un inhibiteur à large spectre des caspases, abolit la mort cellulaire immunogène. Ceci indique donc que l'induction de cette mort immunogène est caspases-dépendante.

C'est sur ces bases de connaissances que notre laboratoire a caractérisé les événements essentiels à une mort cellulaire immunogène induite par certaines anthracyclines et par l'oxaliplatine. Cette immunogénicité des cellules tumorales mourantes pré-traités requière 3 points essentiels, à savoir une exposition à la surface cellulaire de la calréticuline, qui est une protéine qui se trouve normalement dans le réticulum endoplasmique, une libération d'HMGB1 (HighMobility Group Box 1), protéine nucléaire, qui va aller se fixer sur son récepteur TLR4, et enfin, une libération d'ATP qui va se fixer sur son récepteur P2RX7 (**fig. 12**).



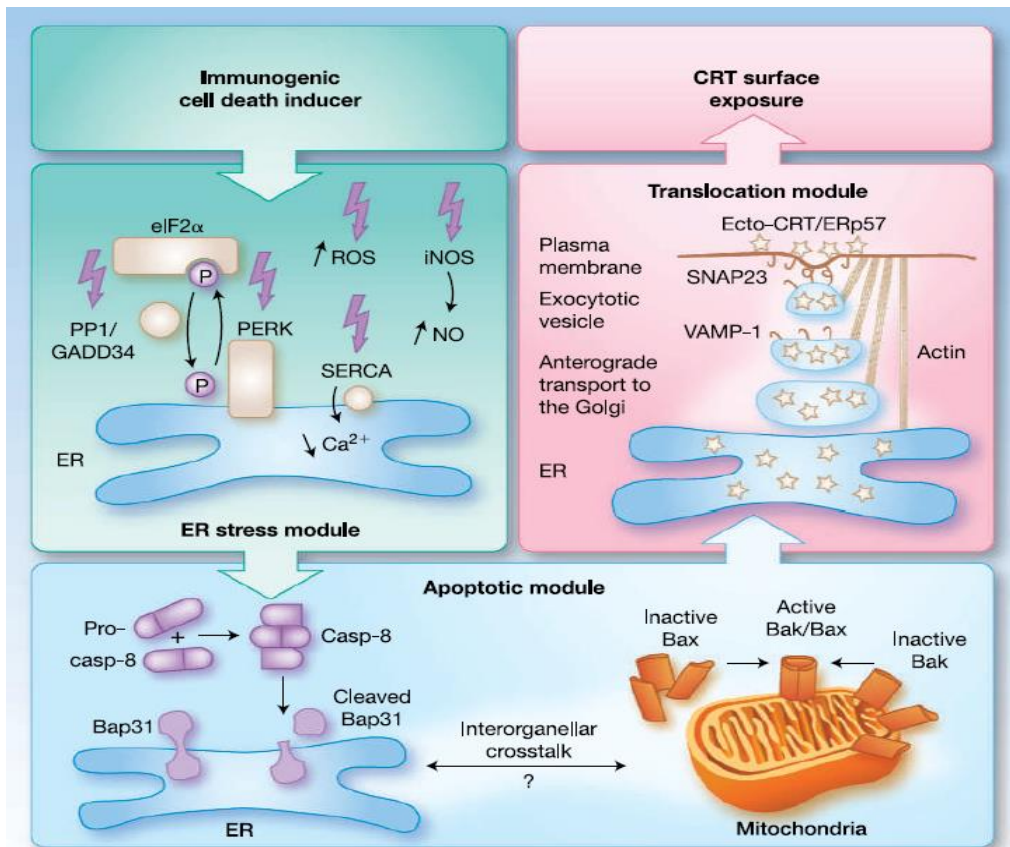
**Fig. 12 Propriétés d'une mort cellulaire immunogène.** Après traitement par une chimiothérapie immunogène, les cellules cancéreuses mourantes vont exposer à leur surface cellulaire la calréticuline, libérer l'ATP et HMGB1 dans le milieu extracellulaire. Ces signaux vont faciliter le recrutement des cellules dendritiques au niveau de la tumeur, la phagocytose des cellules mourantes par les cellules dendritiques et la présentation optimale des antigènes tumoraux aux cellules T. Ceci va engendrer une activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> IL-1β et IL-17 dépendante. (Kroemer, Galluzzi et al. 2013)

### 3.1) Calréticuline et ERp57 : signal de danger.

C'est en 1994 que la théorie du danger fut proposée par Polly Matzinger : selon cette théorie, il existerait des récepteurs sur les cellules du système immunitaire capables de discerner une situation dangereuse (ou pathogène) d'une situation non-dangereuse (non pathogène). Ainsi, les récepteurs décrits par Janeway, qui sont les Pattern Recognition Receptor, pourraient donc en faire partis. Aujourd'hui, grâce aux avancées faites dans la recherche, il est devenu évident que les cellules mourantes ou souffrantes vont soit libérer des signaux, soit exposer des signaux à leur surface membranaire dans l'optique d'activer le système immunitaire. Ces signaux sont appelés DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern). L'exposition de la calréticuline à la surface membranaire fait partie de ces DAMPs.

La calréticuline (CRT) a été identifiée en 1974. Cette une protéine soluble de 46kDa qui se trouve dans la lumière du réticulum endoplasmique(ER). Elle possède un domaine N terminal lectine-like, et un domaine C terminal liant le  $\text{Ca}^{2+}$ . En temps normal, la CRT joue un rôle de protéine chaperonne et régule également l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ . Il intervient également dans le bon assemblage des molécules de classe I du CMH (Krysko, Garg et al. 2012).

Quand les cellules tumorales sont traitées avec une chimiothérapie immunogène, la calréticuline va être exposée à la surface cellulaire. La translocation de la CRT après chimiothérapie est un processus actif qui se déroule bien avant l'exposition des phosphatidylsérines à la surface cellulaire. La CRT va interagir de par son domaine central, avec une autre protéine qui se trouve dans la lumière du réticulum endoplasmique, l'ERp57. Cette dernière est indispensable pour l'exposition de la CRT à la surface membranaire, et ce n'est qu'une fois le complexe CRT/ERp57 formé qu'il pourra être transloqué et exposé à la surface cellulaire (**fig. 13**, (Panaretakis, Joza et al. 2008, Zitvogel, Kepp et al. 2010)).



**Fig. 13 Les modules impliqués dans l'exposition de la calréticuline (CRT).** Trois modules distincts sont impliqués dans l'exposition de la CRT : le module du stress du réticulum endoplasmique (RE), mettant en jeu, entre autre, la phosphorylation d'eIF2α due à l'activation de PERK. Le module apoptotique qui comprend l'activation de la caspase 8, qui va cliver à son tour Bap31, et activer les protéines de la famille Bcl-2, Bax et Bak. Et enfin, le module de translocation, où la CRT va finalement être exposée à la surface cellulaire avec ERp57. (Zitvogel, Kepp et al. 2010)

Dans l'expérience menée par Panaretakis *et al*, il a été démontré que cette voie de translocation se faisait par la kinase PERK (ou EIF2AK3) qui va aller phosphoryler eIF2α (eukaryotic translation initiation factor) au niveau de la sérine en position 51. PERK et eIF2α sont tous deux acteurs lors d'un stress du réticulum endoplasmique. Un mutant non phosphorylable de eIF2α (S51A) ainsi qu'une déplétion de PERK par un siRNA spécifique abolissent l'exposition à la surface de CRT/ERp57 dans les cellules traitées par les anthracyclines, mais pas l'apoptose de la cellule. Les inhibitions d'autres facteurs menant au stress du réticulum endoplasmique (notamment ATF6 et IRE1) n'ont pas d'impact sur l'exposition membranaire de CRT/ERp57.

Ils ont ainsi montré que PERK et eIF2α étaient les facteurs clés du stress du réticulum endoplasmique, indispensables à la translocation à la surface membranaire de CRT/ERp57. En aval de ce stress du réticulum endoplasmique, on va avoir l'activation de la caspase 8, qui va aller à son tour cliver Bap31, ce qui va aboutir à l'activation de

Bax/Bak. Ce n'est qu'ensuite qu'on va avoir l'exocytose de CRT/ERp57 grâce à des vésicules, et de façon SNARE dépendante. L'exposition de CRT/ERp57 est suivie irrémédiablement de la mort de la cellule, suggérant que l'exposition de CRT/ERp57 à la surface cellulaire est la conséquence d'un certain nombre de dommages irréversibles de la cellule. Cependant, l'induction de l'apoptose n'est habituellement pas précédée par l'exposition à la surface cellulaire de CRT/ERp57, et seuls un certain nombre restreint d'inducteurs de mort cellulaire sont capables d'induire une mort cellulaire immunogénique (Panaretakis, Joza et al. 2008).

Dans les travaux menés par Obeid *et al*, il a été montré que l'exposition de la CRT à la surface cellulaire des cellules tumorales mourantes agissait comme un signal « eat me », et permettait aux cellules d'être rapidement phagocytées par les cellules dendritiques. L'inhibition de l'exposition de la CRT à la membrane plasmique des cellules traitées par la mitoxantrone (MTX), aussi bien par l'utilisation d'un anticorps spécifique que par un knockdown avec un siRNA spécifique de la CRT, abolissent la phagocytose des cellules tumorales par les cellules dendritiques, et ainsi leur immunogénicité. L'addition d'une protéine CRT recombinante (rCRT) restaure l'immunogénicité aux cellules tumorales déficientes en CRT. L'exposition de la CRT à la surface des cellules et leur phagocytose se font très rapidement, seulement quelques heures après traitement par la mitoxantrone (MTX) ou par la doxorubicine (DX), et ce avant tout apparition de signe d'apoptose (Obeid, Tesniere et al. 2007).

La MTX, l'oxaliplatine (OXA) ou la DX sont des drogues capables d'induire l'exposition à la membrane plasmique de la CRT ainsi que de conférer l'immunogénicité des cellules, mais il a été montré que la cisplatine (CDDP), un composé apparenté à l'OXA mais qui n'induit pas de stress du ER car il n'active pas PERK et ne permet pas la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , échoue à induire une exposition de la CRT à la surface membranaire et de ce fait, à induire l'immunogénicité aux cellules tumorales mourantes. L'utilisation de la CDDP en combinaison avec un inducteur de stress du ER, la thapsigargine, permet de restaurer l'exposition de la CRT (Martins, Kepp et al. 2011).

### 3.2) Heat shock proteins

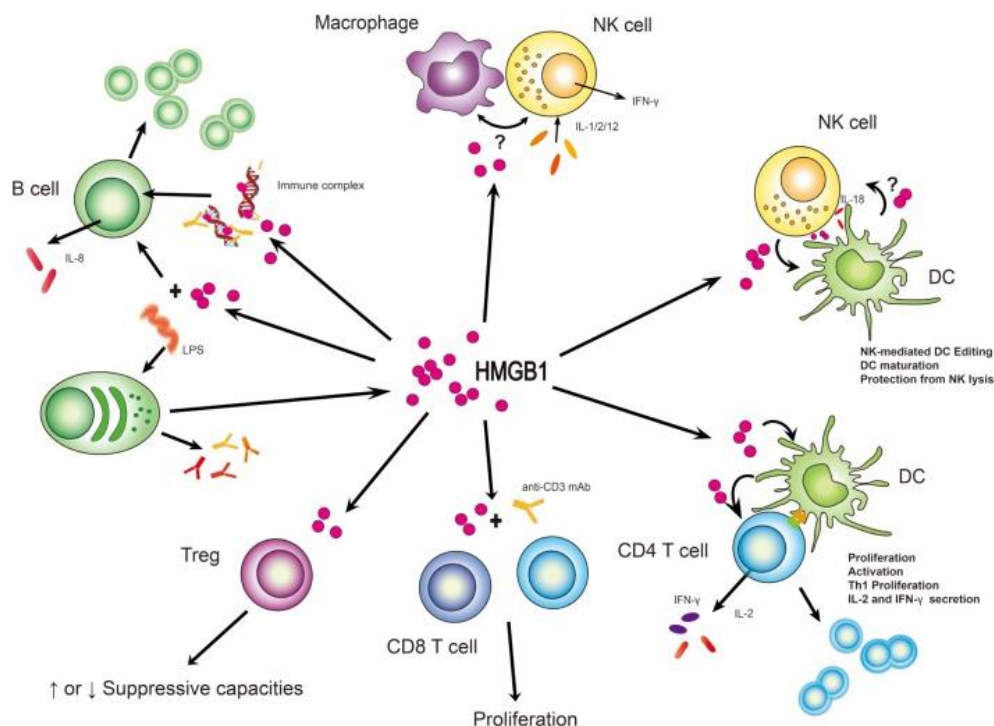
Les protéines HSP (Heat shock proteins) ont été tout d'abord découvertes chez la drosophile en 1962 comme étant des protéines qui s'accumulent dans la cellule après un choc thermique et possédant des propriétés thermorésistantes. Dans les conditions physiologiques, les HSP sont exprimées à de faibles niveaux. Mais dans des conditions de stress (comme par exemple les radiations par les rayons ultraviolets, un choc thermique, une infection virale, bactériologique ou parasitaire), la synthèse intracellulaire des HSP est augmentée. Tout comme la CRT, les HSP ont pour fonction primaire d'être des protéines chaperonnes qui s'assurent du bon repliement des protéines nouvellement synthétisées ou des protéines mal repliées. Les HSPs de mammifères ont été classées en 5 familles selon leur poids moléculaire. Parmi ces différentes familles, HSP70 et HSP90 sont celles qui ont été les plus largement étudiées dans le cancer. HSP70 est très faiblement exprimée dans les cellules normales, non stressées, mais elle est fortement exprimée de façon transitoire après différents stress tels que le stress oxydatif ou une chimiothérapie. Son expression est anormalement élevée dans les cellules cancéreuses, leur permettant ainsi de résister aux chimiothérapies. HSP90, est quant à elle, une protéine cytosolique très abondante, mais qui est accumulée dans les cellules tumorales. Des études cliniques ont montré qu'un niveau élevé de HSP70 ou de HSP90 était associé à un mauvais pronostic dans le cancer et à une résistance à la chimiothérapie ou à la radiothérapie (Didelot, Lanneau et al. 2007, Joly, Wettstein et al. 2010). Les HSP peuvent interagir avec le système immunitaire : en effet, en plus de leur rôle de protéine chaperonne, les HSP sont capables d'induire une réponse immunitaire en se liant à des récepteurs spécifiques des cellules spécialisées du système immunitaire et à induire une sécrétion de molécules immunes. C'est ainsi que dans les années 2000 apparaît le nom de « chaperokine », qui permet de mieux caractériser la fonction de chaperonne et de cytokine des HSP.

Avec leur propre mécanisme d'action qui leur est spécifique, les HSP participent également à la réponse anti-tumorale.

### 3.3) HMGB1 et TLR 4

High-mobility group box 1 (HMGB1) est une protéine nucléaire hautement conservée, associée à la chromatine, de type non-histone, qui agit comme protéine chaperonne du repliement de l'ADN et qui facilite l'assemblage de protéines transcriptionnelles sur les cibles spécifiques de l'ADN. En plus de son rôle nucléaire, HMGB1 joue également le rôle de signal de danger une fois libérée dans le milieu extra-cellulaire, dans les cas de métastases, d'inflammation, de différenciation cellulaire (**fig. 14**). HMGB1 peut être libéré dans le milieu extra-cellulaire de plusieurs manières : passivement dans le cas de cellules nécrotiques, ou alors activement dans le cas de cellules inflammatoires. Dans ce dernier cas, HMGB1 se lie avec haute affinité à ses récepteurs, tels que RAGE (Receptor for advanced glycation end-products), Toll-like receptor (TLR)-2, TLR-4 et TLR-9. Après s'être liés à leur ligands, les TLR vont activer 2 voies de signalisation distinctes : la voie mettant en jeu la protéine adaptatrice TRIF (Toll/Il-1R domain-containing adaptor inducing IFN $\alpha$ ), ou la voie mettant en jeu la protéine adaptatrice Myd88 (Myeloid differentiation primary response protein).





**Fig. 14 Les actions d'HMGB1 sur les cellules du système immunitaire.** HMGB1 agit à de nombreux niveaux dans les interactions entre les cellules lymphoïdes et myéloïdes. Ses fonctions les mieux connues sont celles intervenant dans les interactions entre cellules NK et macrophages et entre les cellules NK et les DCs. Il est également supposé qu'il occupe un rôle majeur dans les fonctions des lymphocytes T et B. Il constitue de ce fait une molécule importante dans la mise en place de la réponse immunitaire (Li, Liang et al. 2013).

Il a été par ailleurs, montré que la sur-expression de HMGB1 était associée à tous les hallmarks principaux du cancer.

En 2007, dans leur recherche des TLRs pouvant être impliqués dans une mort cellulaire immunogène, Apetoh *et al.* ont montré que l'expression du TLR4 à la surface des cellules dendritiques et la libération de HMGB1, perçue comme signal de danger, étaient tous deux indispensables pour une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique et pour l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie chez la souris. L'importance de TLR4 et d'HMGB1 ont été confirmés par la suite grâce à une étude d'une cohorte de 280 patientes, atteintes par le cancer du sein non métastatique : il a été montré qu'un polymorphisme de TLR4 (Asp299Gly) réduisait de façon significative sa liaison avec HMGB1 et il en résulte une diminution de la capacité des DCs à présenter les antigènes aux lymphocytes T. Les patientes présentant cette mutation avaient une fréquence plus élevée de métastases dans les 5 ans après la chirurgie comparées aux patientes ne possédant pas la mutation. Ainsi, une mutation fonctionnelle de TLR4 empiétant sur

l'intégrité de la voie HMGB1/TLR4 empêche la réussite de la chimiothérapie basée sur l'utilisation des anthracyclines dans le cancer chez l'Homme (Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007).

### 3.4) ATP et récepteurs purinergiques.

L'ATP (Adénosine-5'-triphosphate) a été identifié en 1970 comme étant un transmetteur responsable de la neurotransmission non adrénergique et non cholinergique dans les intestins et la vessie. C'est ainsi qu'en 1972, Burnstock propose le terme « purinergique », en rapport avec ses travaux portant sur l'implication de l'ATP dans la neurotransmission (Burnstock 1972). L'ATP est une molécule fondamentale qui fournit de l'énergie nécessaire aux réactions chimiques des cellules. Elle est composée de l'adénine, de ribose et de 3 groupements phosphates. L'ATP est produite lors de plusieurs mécanismes, comme la glycolyse aérobie. Une molécule de glucose permet de générer 38 molécules d'ATP (Kroemer and Pouyssegur 2008).

En 1978, il a été identifié deux familles de purinocepteurs: la famille P1, récepteur pour l'adénosine, et la famille P2, récepteur pour l'ATP et l'ADP. En 1985, il a été montré, en se basant sur des données pharmacologiques, qu'il existait deux types de purinocepteurs P2 : P2X et P2Y (Burnstock and Kennedy 1985). Cependant, ce n'est qu'en 1990 que l'hypothèse des récepteurs purinergiques a vraiment été acceptée, avec le clonage et la caractérisation des récepteurs P1 et P2. De plus, cela a pu montrer que la famille des P2X était un récepteur de type canal ionique activé par un ligand, alors que la famille des P2Y, était un récepteur couplé à la protéine G (Abbracchio and Burnstock 1994).

Il a été montré actuellement 4 sous-familles du récepteur P1, 7 sous-familles du récepteur P2X et 8 sous-familles du récepteur P2Y, répartis sur une grande majorité des cellules du corps humain comme le montre le **tableau 3**. (Burnstock 2007).

Au sein de la famille des récepteurs P2X, il existe une grande diversité pharmacologique et de mode d'action entre les différentes sous-unités. Les cinétiques d'activation, d'inactivation et de désactivation sont également très variables (Burnstock 2012).

Les récepteurs P2Y sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Ils possèdent un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal

intracellulaire, contenant des sites de liaisons pour les protéines kinases. Sous certaines conditions, P2Y peut soit former des structures homomultimériques, soit des structures hétéromultimériques, et certains tissus peuvent exprimer différents types de sous-unités P2Y (Burnstock 2012).

Parmi les récepteurs purinergiques, le récepteur humain P2X7 est un récepteur qui est exprimé dans quasiment tous les tissus et organes du corps, avec une expression plus élevée sur les cellules du système immunitaire de type monocyte-macrophage (Wiley, Sluyter et al. 2011). Cloné pour la première fois en 1996, il possède deux domaines transmembranaires, avec un domaine N-terminal et C-terminal intracellulaires. Ce récepteur homotrimérique est activé par l'ATP extracellulaire. Cette activation est associée à un efflux massif de K<sup>+</sup>, qui est un cofacteur pour l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et pour la sécrétion par les cellules myéloïdes d'interleukines inflammatoires. Une activation prolongée de P2X7 entraîne une mort cellulaire par apoptose.

Smooth muscle	P2X1, P2X2, P2X4, P2X7, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub>
Cardiac muscle	P2X1-6, P2Y <sub>2</sub> (plus P2X7 and P2Y <sub>1</sub> in isolated ventricle myocytes)
Skeletal muscle	P2X1-6, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub> (transiently expressed during development)
Osteoblasts	P2X7, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub>
Cartilage	P2X2, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub>
Keratinocytes	P2X2, P2X3, P2X5, P2X7, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , A <sub>2B</sub>
Fibroblasts	P2X7, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , A <sub>2A</sub>
Adipocytes	P2X1, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , A <sub>1</sub>
Epithelial cells	P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>11</sub> , A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>3</sub>
Hepatocytes	P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>13</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>3</sub>
Glial cells	P2X1-7, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>11</sub> , P2Y <sub>12</sub> , P2Y <sub>13</sub> , A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub>
Sperm	P2X2, P2X7, P2Y <sub>2</sub> , A <sub>1</sub>
Endothelial cells	P2X1, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub> , A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub>
Erythrocytes	P2X2, P2X4, P2X7, P2Y <sub>1</sub>
Platelets	P2X1, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>12</sub> , A <sub>2A</sub>
Immune cells <sup>a</sup>	P2X1, P2X4, P2X7, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>3</sub>
Exocrine cells	P2X1, P2X4, P2X7, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub>
Endocrine cells	P2X1-7, P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>
Special senses	
Inner ear	P2X1, P2X2, P2X3, P2X7, P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , A <sub>1</sub>
Eye	P2X2, P2X7, P2Y <sub>2</sub> , A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub>
Tongue	P2X2, P2X3, P2Y <sub>1</sub> , A <sub>1</sub>
Olfactory organ	P2X2, P2X4, P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>3</sub>

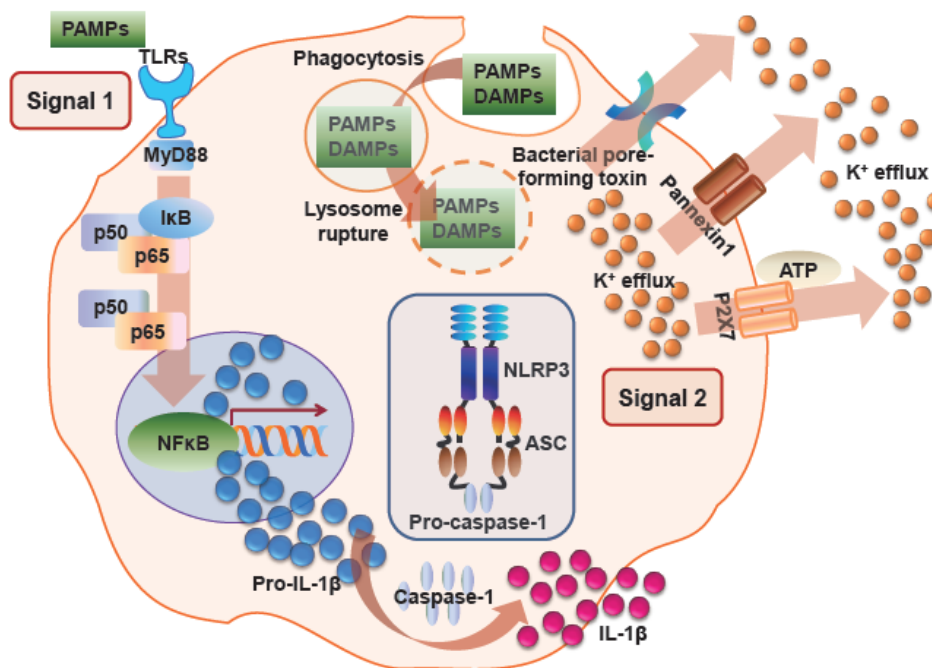
**Tab. 3 Répartition des principaux récepteurs P1 et P2 sur les cellules non neuronales** (Burnstock 2012).

### 3.4.1) ATP et mort cellulaire immunogène.

Les signaux purinergiques jouent un rôle essentiel au sein du système immunitaire en amplifiant les réponses immunitaires et les interactions hôte-pathogène (Davis, Sullender et al. 2004). L'ATP libérée par les cellules endommagées ou par les cellules du système immunitaire, peut moduler des réponses immunes telles que la sécrétion d'interleukines (Junger 2011), servir de signal de chimiotaxie (Chen, Corriden et al. 2006, Junger 2011), et permet d'activer les cellules T (Schenk, Westendorf et al. 2008, Woehrle, Yip et al. 2010).

Martins et *al.* ont montré qu'après traitement des cellules tumorales par certaines chimiothérapies, une quantité importante d'ATP était retrouvée dans le surnageant des cultures cellulaires, et ce avant même que les premiers signes d'apoptose n'apparaissent (Martins, Tesniere et al. 2009).

L'activation du récepteur P2X7 est essentielle dans la réponse immunitaire, aussi bien innée qu'adaptative. En effet, celle-ci va permettre l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing-3 protein), qui comprend la protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD) et la procaspase-1. Une fois activée, NLRP3 va initier une cascade d'évènements : la procaspase-1 est clivée en caspase-1, qui va permettre à son tour de transformer la pro-IL-1 $\beta$  en IL1 $\beta$  (**fig.15** (Wiley, Sluyter et al. 2011)).



**Fig. 15 Schéma d'activation de l'inflammasome NLRP3.** L'activation de NLRP3 mène à la sécrétion de l'interleukine (IL)-1 $\beta$  et d'IL-18. De nombreux PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) et/ou DAMP (Danger-associated patterns) activent l'inflammasome NLRP3. Le signal 1 amène à l'expression du gène pro-IL-1 $\beta$  et de la protéine pro-IL-1 $\beta$  via la voie de signalisation TLR-MyD88-NF $\kappa$ B. Le signal 2 est critique pour l'activation de l'inflammasome. Ces signaux ou agonistes déclenchent l'assemblage du complexe macromoléculaire NLRP3 via le recrutement de ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a C-terminal caspase-recruitment domain) et de la pro-caspase-1 (Yang, Shin et al. 2012).

De nombreux produits bactériens et des signaux de dangers sont connus pour activer l'inflammasome NLRP3. Dans un article publié dans *Nature Med*, Ghirighelli *et al*, ont montré que l'activation de l'inflammasome au sein des DCs était nécessaire pour une réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses mourantes. En effet, ils ont montré que la libération d'ATP lors d'une chimiothérapie était indispensable pour induire une mort cellulaire immunogène, au même titre que l'exposition de la CRT à la surface cellulaire et la libération d'HMGB1. Après chimiothérapie par les anthracyclines ou par l'oxaliplatine, l'activation de l'inflammasome NLRP3 va aboutir à la production d'IL1 $\beta$ , ce qui va amener à une polarisation de la population des lymphocytes T en CD8+, et au final, à une production d'IFN- $\gamma$  (Ghirighelli, Apetoh et al. 2009). Une étude clinique étudiant le polymorphisme de P2X7 a montré qu'une perte d'affinité du récepteur pour l'ATP était un mauvais pronostic dans l'apparition de métastases chez les patientes traitées

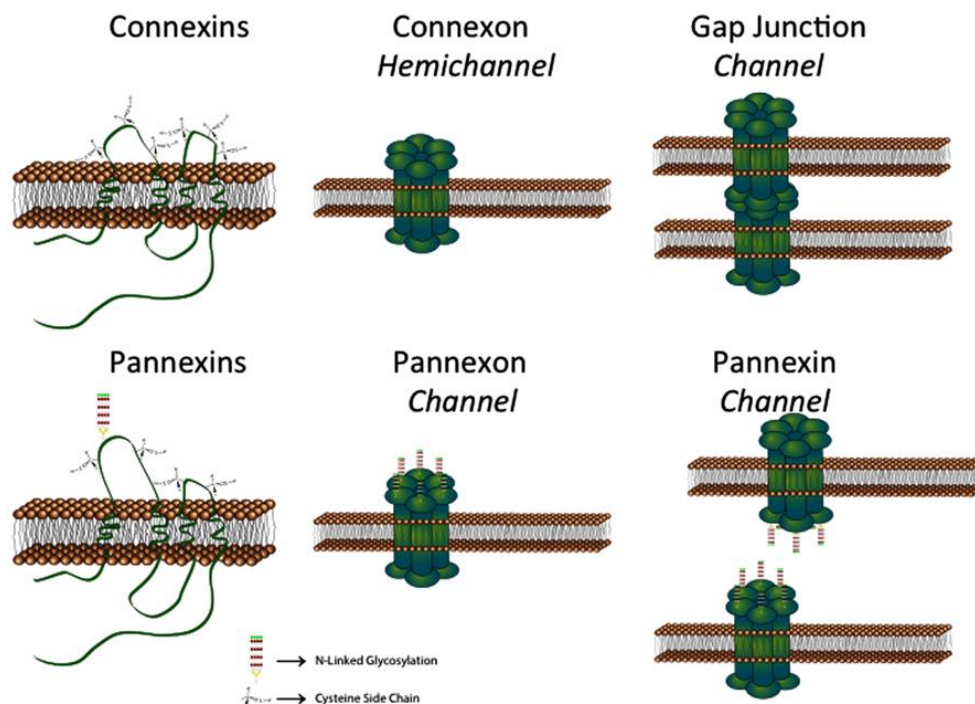
pour le cancer du sein. Ceci montre donc l'importance de la voie ATP-P2X7 dans les chimiothérapies immunogènes.

L'exocytose a été l'un des premiers mécanismes de libération d'ATP décrite. Mais récemment, un certain nombre de canaux font l'objet d'étude dans la libération d'ATP, dont l'hémicanal pannexine 1 (Riteau, Gasse et al. 2010).

### 3.5) Pannexine 1

La famille des pannexines (Panx) comprend 3 membres, Panx-1, Panx-2 et Panx-3 (Baranova, Ivanov et al. 2004). Panx-1 est exprimée de façon ubiquitaire (Scemes, Spray et al. 2009), Panx-2 se trouve principalement au niveau du système nerveux central, et Panx-3 est localisée au niveau des ostéoblastes, des fibroblastes synoviaux et des chondrocytes (Barbe, Monyer et al. 2006, Velasquez and Eugenin 2014).

A l'origine, il a été émis comme hypothèse que les pannexines (PANX) pouvaient former des canaux type « gap junctions » entre les cellules adjacentes. Cependant, des travaux récemment publiés ont montré que PANX étaient incapables de former des canaux intercellulaires (**fig. 16**, (Boassa, Ambrosi et al. 2007)).



**Fig. 16 Schéma représentatif des canaux connexines et pannexines.** Contrairement aux connexines, les pannexines ne forment pas de « gap junctions » mais forment des hémicanaux. (Giaume, Leybaert et al. 2013)

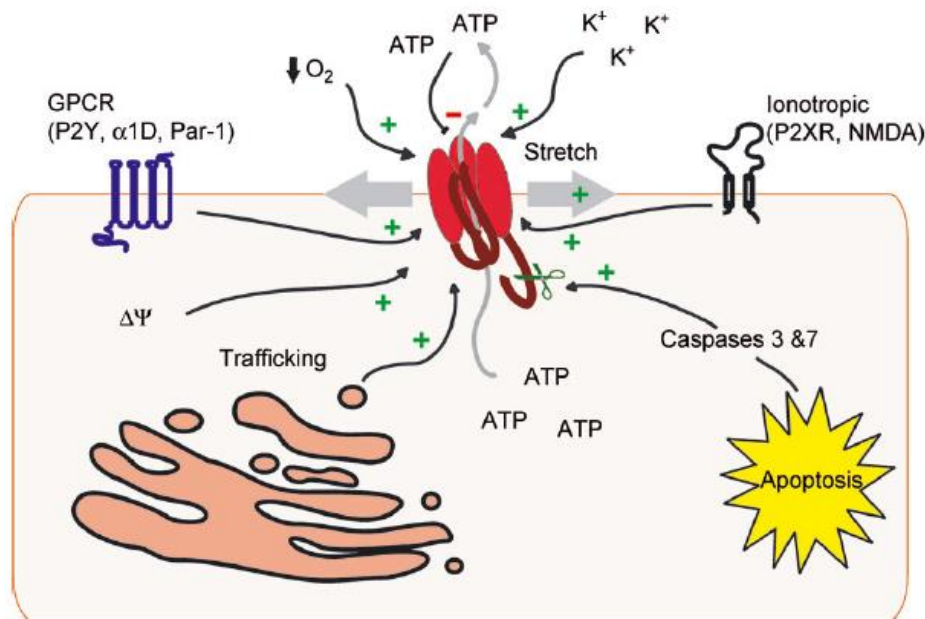
La structure des pannexines est similaire à celle des connexines, bien qu'elles ne partagent aucune séquence homologue. La structure des pannexines consiste en des domaines N-terminal et C-terminal cytosoliques et quatre domaines transmembranaires, dont deux boucles extracellulaires (Penuela, Bhalla et al. 2007). Etant ubiquitairement exprimée, PANX1 a été la plus étudiée. Une fois activée par une dépolarisation de la membrane (par un changement dans la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par exemple), PANX1 forme un hémicanal non sélectif au niveau de la membrane plasmique, permettant le passage de petites molécules inférieures à 1kDa. Il a été démontré pour la première fois en 2004 que PANX1 permettait la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire, ce dernier allant par la suite se fixer sur les récepteurs purinergiques et activer les différentes voies de signalisation (Bao, Locovei et al. 2004, Velasquez and Eugenin 2014). De plus, des marqueurs de petite taille, tels que le YO-PRO ou le TO-PRO, peuvent passer dans le milieu intracellulaire, marquant ainsi les cellules en apoptose précoce. En effet, le YO-PRO et le TO-PRO sont des marqueurs très sensibles des acides nucléiques double-brin. Ainsi, lorsque les cellules entrent en apoptose et présentent une perméabilisation précoce de la membrane, le YO-PRO et le TO-PRO peuvent entrer dans la cellule, permettant de discriminer les cellules en apoptose des cellules mortes grâce à un co-marquage avec un marqueur de la mort cellulaire de plus haut poids moléculaire tels que l'iodure de propidium (qui est un agent intercalant des acides nucléiques émettant une lumière rouge et utilisé comme marqueur des noyaux des cellules ayant perdu l'intégrité de leur membrane plasmique, caractéristique des cellules nécrosées) ou le DAPI (de même que pour l'iodure de propidium, le DAPI permet de caractériser les cellules nécrosées par sa capacité à se lier aux bases adénine et thymine de l'ADN et à émettre une fluorescence bleue).

Lors d'une mort cellulaire par apoptose, les cellules relarguent de l'ATP dans le milieu extracellulaire, suggérant ainsi une activation de pores membranaires, telles que les connexines ou les pannexines. Cheken *et al.*, ont montré en 2010 que ce sont les hémicanaux pannexines et non connexines qui étaient impliqués dans la libération d'ATP. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de connexine, tels que l'acide 18-alpha-glycyrrhétinique ou l'acide flufenamique, n'a aucun effet sur cette libération d'ATP par les cellules apoptotiques. Cependant, l'utilisation de probénicide, un inhibiteur spécifique des canaux pannexines, inhibe la libération d'ATP, ce qui a pour conséquence une diminution des recrutements de monocytes. Ils ont également montré que PANX1

étaient sélectivement activés dans les cellules en apoptose, permettant ainsi le relargage de l'ATP qui va servir ensuite de signal « find-me » et permettre le recrutement de monocytes et macrophages (Chekeni, Elliott et al. 2010).

L'activation de PANX1 est un mécanisme hautement dynamique. En effet, elle nécessite un clivage de son domaine C-terminal : ce dernier agit comme un auto-inhibiteur de la pannexine. De la forme tronquée de la PANX1 en son domaine C-terminal (hPANX1 $\Delta$ 371) résulte d'un cannel pannexine constitutivement actif, sans qu'il y ait besoin de signal d'apoptose. L'ajout du domaine C-terminal seul suffit pour inactiver la forme constitutivement active (Sandilos, Chiu et al. 2012). Des facteurs environnementaux peuvent activer PANX1. Ces mécanismes sont particulièrement utiles pour les érythrocytes, qui sont dépourvus de la machinerie nécessaire pour l'exocytose vésiculaire. En effet, dans des conditions d'hypoxie, les érythrocytes vont pouvoir libérer l'ATP *via* PANX1 (Sridharan, Adderley et al. 2010). D'autre part, il a été montré un lien existant entre l'ATP libérée par PANX1 et l'activation des récepteurs P2X7 ainsi que des voies de signalisation se trouvant en aval, menant à la production d'IL-1 $\beta$  (Pelegriin and Surprenant 2006). L'activation du récepteur P2X7 va constituer à son tour un signal activateur pour PANX1, formant ainsi une boucle rétrograde positive. Il a été démontré que d'autres membres de la famille P2X pouvaient également avoir cet effet activateur sur PANX1 (Woehrle, Yip et al. 2010). Il a également été montré que le couple P2X-PANX1 intervenait dans de nombreux processus du système immunitaire, tels que l'activation des cellules T, la régulation des neutrophiles et la chimiotaxie pour les macrophages (Chen, Corriden et al. 2006, Schenk, Westendorf et al. 2008). Cependant, le mécanisme moléculaire exact par lequel PANX1 est activé en aval des récepteurs P2X n'est pas encore connu. Bien que PANX1 puisse être activé de façon indirecte par l'ATP extracellulaire *via* les récepteurs P2X, une concentration trop élevée en ATP extracellulaire peut inhiber de façon directe les hémicanaux PANX1, formant ainsi une boucle rétrograde négative (**fig. 17**, (Qiu and Dahl 2009)).

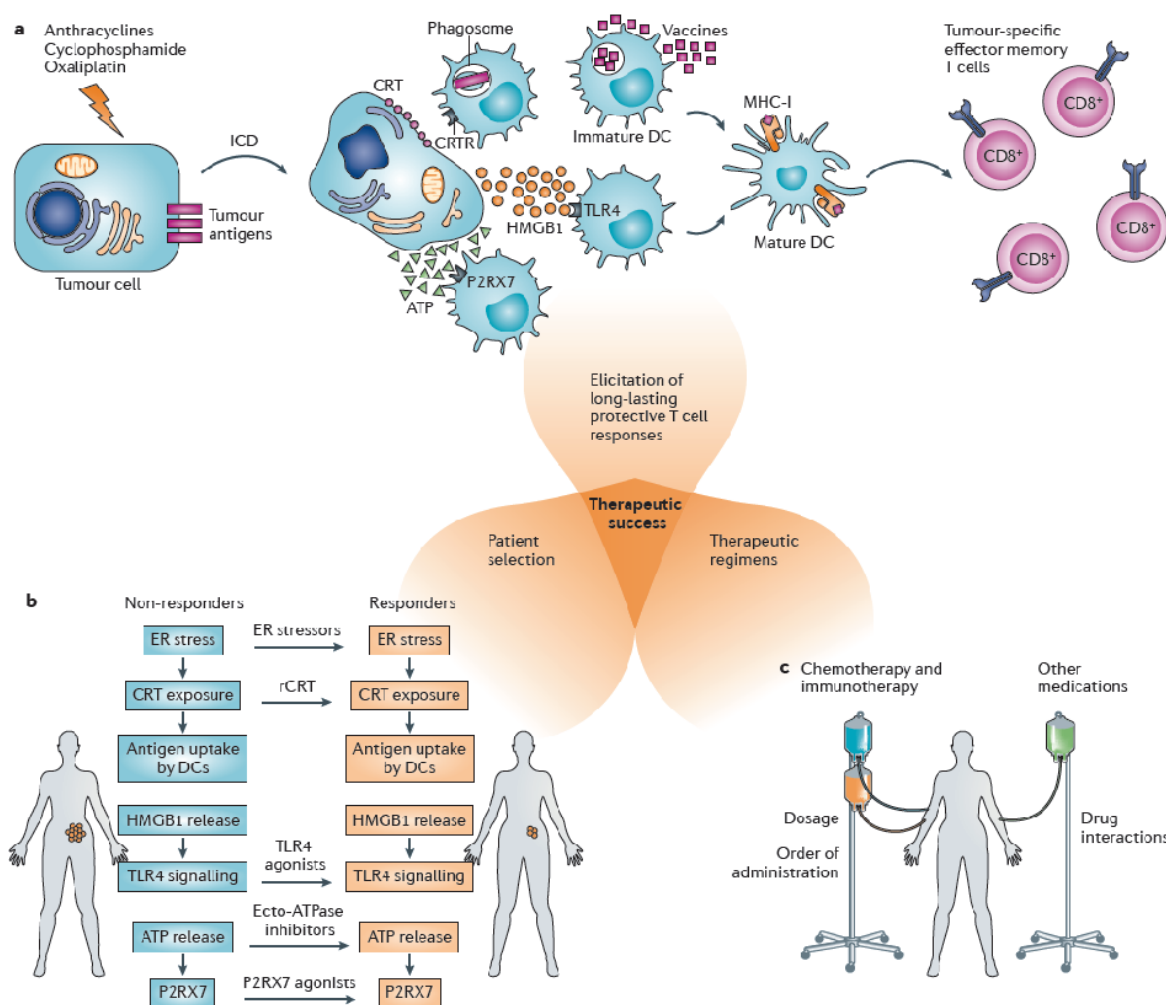




**Fig. 17 Mécanismes d'activation et d'inhibition de pannexine 1** Les principaux mécanismes d'activation de l'hémicannal PANX1 se font *via* un étirement de la membrane plasmique, la dépolarisation membranaire, la concentration en potassium extracellulaire, un faible taux en oxygène, activation de récepteur couplé à la protéine G, le clivage de caspases et activation de récepteurs ionotropiques tels que P2X. Cependant, une concentration trop élevée en ATP extracellulaire inhibe de façon directe PANX1 (Sandilos and Bayliss 2012).

### Conclusion Partie III

La mise en évidence de la mort cellulaire immunogène est une avancée considérable dans l'amélioration des traitements proposés actuellement aux patients atteints de cancer, qui présentent une forte cytotoxicité, avec des taux de rechute parfois importants. Une chimiothérapie pouvant induire la maturation de lymphocytes T mémoires spécifiques des antigènes de la tumeur pourrait de ce fait protéger les patients à long terme. Néanmoins, ce genre de thérapie ne conviendrait pas à tout le monde, du fait de la grande diversité génomique. Son succès repose sur une réponse immunitaire intacte, la bonne réponse du patient face au traitement et l'absence de défaut de la tumeur. Cependant, certains défauts peuvent être corrigés pharmacologiquement (**fig. 18** (Martins, Kepp et al. 2011)).



**Fig. 18 Les éléments requis pour un succès de la chimiothérapie.** Le traitement proposé doit pouvoir induire la formation de lymphocytes T mémoires chez les patients sélectionnés, présentant une voie de signalisation intacte permettant la mise en place de la mort cellulaire immunogène. Le dosage des traitements choisis, leur ordre d'administration et les interactions pouvant survenir avec d'autres médicaments doivent être soigneusement étudiés (Galluzzi, Senovilla et al. 2012).

Notre laboratoire a ainsi pu mettre en évidence que pour être immunogénique, une chimiothérapie devait nécessairement déclencher trois évènements bien précis, et que l'absence d'un de ces phénomènes empêchait l'induction de la mort immunogénique de la cellule tumorale. Cependant, les mécanismes permettant la survenue de ces trois évènements clés ne sont pas encore clairs.

## Objectif de l'étude et données préliminaires.

### Autophagie et libération d'ATP.

Le but de nos recherches est de mieux comprendre les mécanismes pour mieux lutter contre le cancer. L'utilisation d'une chimiothérapie immunogène pourrait aboutir à la mise en place d'un vaccin en utilisant les cellules tumorales mourantes du patient, traitées au préalable par les anthracyclines, et qui stimuleraient le système immunitaire pour combattre, si nécessaire, les cellules tumorales résiduelles chez le patient. Parmi les trois grandes caractéristiques de la mort cellulaire immunogène, les mécanismes menant à la libération d'ATP restent évasives. L'importance de la libération d'ATP lors d'une chimiothérapie immunogène a été démontrée dans les travaux de Michaud *et al.* Ils ont émis l'hypothèse qu'un lien pouvait exister entre l'autophagie et la libération d'ATP étant donné que l'autophagie est impliquée dans le stress du RE. Pour cela, ils ont utilisé des cellules cancéreuses colorectales de souris, les CT26, et des MCA 205, sarcome de souris, déficientes pour l'autophagie (Atg5<sup>KD</sup> ou Atg7<sup>KD</sup>) ou non (WT). Il a été montré que les cellules déficientes pour l'autophagie libéraient une quantité moindre d'ATP après traitement par mitoxantrone (MTX) que les cellules compétentes pour l'autophagie. Les expériences *in vivo* de vaccination ont montré que les cellules WT traitées au préalable par les anthracyclines proféraient une protection aux souris lors de la ré-injection de cellules tumorales mourantes, mais pas les cellules déficientes en autophagie. De plus, les cellules déficientes pour l'autophagie échouent à apprêter les LT *in vivo*. Cette protection immunitaire est retrouvée lorsque l'ARL67156, un ecto-ATPase, est injecté aux souris ayant eu la vaccination avec les cellules déficientes pour l'autophagie. De manière surprenante, bien que l'autophagie soit indispensable pour une libération optimale d'ATP, elle n'est pas requise pour la réalisation des autres signaux de la mort immunogénique. Ils ont également démontré dans cet article que l'autophagie n'était pas requise pour l'apoptose des cellules tumorales, mais qu'elle était nécessaire pour le recrutement des DCs et des LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> au site tumoral. Ainsi, un déficit en autophagie abolirait la capacité des cellules cancéreuses à induire une réponse immunitaire. Chez l'Homme, l'autophagie est souvent déficiente dans les cellules malignes, spécialement durant l'oncogénèse précoce. Ces résultats présentent donc un intérêt conséquent s'ils pouvaient être transposés chez l'humain : une déficience en

autophagie serait comblée pharmacologiquement, ce qui permettrait à l'ATP de fonctionner normalement et de ce fait, induire la réponse immunogénique (Michaud, Martins et al. 2011).

Cependant, les mécanismes de libération de l'ATP sont encore inconnus. Le but de la première partie de mes travaux sera donc de mieux caractériser une des trois voies essentielles de la mort cellulaire immunogène.

## Calréticuline

En conditions physiologiques, la calréticuline (CRT) est la protéine soluble la plus abondante dans le RE. Lors d'une mort cellulaire immunogénique, la CRT est exposée à la surface cellulaire et agit comme un signal « eat-me ». En aval du module de stress du RE, les anthracyclines et l'oxaliplatine activent de nombreux régulateurs de mort cellulaire, incluant la caspase-8 qui est la caspase la plus importante dans l'initiation de l'apoptose extrinsèque, ainsi que BAX et BAK (Kroemer, Galluzzi et al. 2007); (Tait and Green 2010) (Wei *et al.*, 2001). L'inhibition de la caspase-8, de BAX ou BAK, inhibe l'exposition de la CRT à la surface cellulaire, et de ce fait, inhibe la mort cellulaire immunogène induite par les anthracyclines ou par l'oxaliplatine. Il a également été démontré que PI3K (phosphoinositide-3-kinase), le NSF (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor), les protéines d'attachements (SNAP) ainsi que leur récepteurs (SNARE) sont nécessaires pour la translocation finale du module de stress à la surface membranaire. L'exposition de la CRT induite par les anthracyclines nécessite la formation de ROS (reactive oxygen species) et de l'oxyde nitrique. Le knockdown de la CRT (ou de toutes protéines nécessaires pour l'exposition de la CRT à la surface) abolit l'immunogénicité de la mort cellulaire après traitement par les inducteurs de la mort cellulaire immunogène.

La littérature actuelle suggère des mécanismes d'exposition de la CRT à la membrane plasmique de haute complexité, et qui requièrent d'avantage de recherches. En effet, il est admis que le stress du RE est requis pour l'exposition de la CRT à la surface cellulaire, mais les mécanismes moléculaires exacts qui relient ces deux phénomènes ne sont pas clairs.

C'est donc dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes d'exposition de la CRT que se porte la deuxième partie de mes travaux.

## Matériels et Méthodes

### Produits chimiques, lignées cellulaires et conditions de culture

Les milieux, les antibiotiques et les suppléments pour la culture cellulaire ont été commandés chez Gibco-Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Le matériel plastique provient de Corning B.V. Life Sciences (Schiphol-Rijk, Pays-Bas) et les produits chimiques sont fournis par Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). H-1152 a été commandé chez Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA), le benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone (Z-VAD-fmk) vient de Bachem (Bubendorf, Suisse), le sulfate G418 De Calbiochem (San Diego, CA, USA) et la puromycine et la zéocine ont été commandées chez Invivogen (San Diego, CA, USA). Le rCXCL8, rCCL2 et rCxcl2 proviennent de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Les cellules de carcinome de colôn de souris CT26 (CMH de classe I, haplotype H-2<sup>d</sup>, syngénique pour les souris BALB/c) et les cellules de fibrosarcome murines MCA205 (CMH de classe I, haplotype H-2<sup>b</sup>, syngénique pour les souris C57Bl/6) et toutes les lignées cellulaires issues de ces lignées murines ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 auquel nous avons ajouté 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF), 10mM de buffer HEPES, 10U/ml de sodium de pénicilline, et 10µg/ml de streptomycine sulfate. Les cellules MCA205 contrôles (SCR), Atg5<sup>KD</sup> et Atg7<sup>KD</sup> sont maintenues sous sélection par à 5 µg/ml de puromycine ajoutée au milieu de culture. Les cellules dérivées du cancer du col de l'utérus HeLa et les cellules d'ostéosarcomes humains U2OS ainsi que les lignées qui en sont dérivées sont cultivées dans le milieu Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) complétés par 10% de SVF, 10 U/ml de pénicilline G sodium et 100 µg/ml de streptomysine sulfate. Les cellules U2OS transfectées stablement exprimant LC3-GFP ou HMGB1-GFP sont maintenues sous sélection par à l'ajout de 200 µg/ml de l'antibiotique G418. Les U2OS exprimant stablement la fusion CRT-GFP sont cultivées en présence de 100 µg/ml de zéocine. Pour obtenir les cellules exprimant stablement LC3-GFP, LC3-RFP, H2B-RFP ou encore LAMP-RFP, les constructions correspondantes (Addgene, Cambridge, Ma, USA) ont été transfectées dans les cellules U2OS en utilisant l'agent de transfection Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), en suivant les recommandations du fabricant. Les cellules transfectées sont ensuite maintenues sous pression de sélection

avec l'ajout de 500 µg/ml de G418, et les cellules exprimant la GFP ou la RFP ont ensuite été clonées par cytofluorométrie et amplifiées. Les cellules de carcinome du colon humain HCT 116 sont cultivées dans du milieu McCoy's 5A complété avec les produits cités précédemment. Les fibroblastes embryonnaires de souris sont cultivées dans du DMEM avec 10% de SVF, d'acides aminés non essentiels, 100 unités/ml de pénicilline G sodium et 100 µg/ml de streptomysine sulfate. Les cellules HeLa exprimant de façon stable la chimère GFP-LC3 sont maintenues en culture avec la présence de 200 µg/ml de G418 alors que les cellules U2OS co-exprimant stablement la protéine histone 2B avec une fluorescence rouge (H2B-RFP) et la chimère CRT-GFP sont cultivées en présence continue de 200 µg/ml de zéocine et 1 µg/ml de blasticidine.

### Lignées de levure

Les lignées haploïdes sauvages (WT) de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa*, *his3Δ1* ; *leu2Δ0* ; *met15Δ0* ; *ura3Δ0*) et BY4742 (*MATα* ; *his3Δ1* ; *leu2Δ0* ; *lys2Δ0* ; *ura3Δ0*) ainsi que les mutants de BY4741 : *Δcne1* et *Δura1*, utilisées dans l'étude ont été fournies par EUROSCARF (Frankfurt, Allemagne). La lignée *Δmfa1/mfa2* a été générée en délétant *mfa2* de la lignée BY4741 *Δmfa1*, puis en taguant *cne1* avec la GFP en suivant les procédures de Sheff et Thorn, décrites dans « Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*, 2004 » en utilisant des cassettes optimisées de la GFP commandées chez EUROSCARF (pKT209 pour la GFP tagguée)

Les lignées BY4741 *Δgcn2*, *Δyet3* et *Δire1* utilisées pour les études de translocation de Cne1-GFP ont été décrites précédemment.

### Culture des levures

Pour évaluer l'efficacité de reproduction, les lignées de levure sont cultivées à 28°C dans un milieu YEPD (Yeast extract peptone dextrose) contenant 1% d'extrait de levure, 2% de peptone, et 2% de D-glucose. Pour les études de translocation de Cne1-GFP, qui est une protéine de fusion entre l'orthologue de la calréticuline chez la levure et la protéine GFP (nous permettant ainsi de visualiser plus facilement la translocation de Cne1 à la surface membranaire), les lignées de levure sont cultivées à 28°C dans un milieu synthétique complet (SC) contenant 0,17% de base nitrogène de levure (BD Biosciences,

Franklin Lakes, NJ, USA), 0,5% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 30 mg/l d'acides aminés sauf l'histidine qui est à 80mg/l et la leucine qui est à 200mg/l, l'adénine est à 30mg/l, l'uracile est à 320mg/l et le glucose est à 2%. Deux pour cent d'agar a été ajouté pour obtenir le milieu solide.

#### Evaluation microscopique de la relocalisation de Cne1-GFP

Les cultures de levure ayant une croissance exponentielle sont séparées en aliquots et traitées avec 10  $\mu\text{M}$  de MTX ou 100  $\mu\text{M}$  du phéromone de conjugaison « facteur  $\alpha$  » pendant 4h (le phéromone de conjugaison « facteur  $\alpha$  » est produit par les cellules  $\alpha$ , leur permettant d'interagir avec les cellules de type  $a$  et d'arrêter le cycle cellulaire pour permettre la conjugaison des levures. Nous l'avons donc utilisé pour permettre la reproduction des levures). La localisation intracellulaire de Cne1-GFP a été ensuite analysée via le microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un filtre spécifique pour eGFP.

#### Efficacité de reproduction

Pour déterminer l'efficacité de reproduction,  $1 \times 10^7$  de cellules BY4742 ( $\text{MAT}\alpha$ ) ont été mixées avec  $2 \times 10^6$  de cellules BY4741 WT, BY4741  $\Delta\text{cne1}$  ( $\text{MATa}$ ) ou BY4741  $\Delta\text{ura}$  ( $\text{MATa}$ ) dans 20ml de milieu YEPD. Les cultures sont agitées pendant 3h et les aliquotes sont étalés sur des plaques d'agar contenant différents milieux. Puis, le nombre d'haploïdes BY4741 vivants et de cellules diploïdes sont plaquées au nombre de 500 à partir des co-cultures des plaques d'agar SC contenant les acides aminés excepté la lysine et la méthionine. Après 2 jours d'incubation à 28°C, les unités formant des colonies (CFUs) sont numérées et l'efficacité de reproduction est déterminée par un ratio entre les BY4741  $\text{MATa}$  CFUs diploïdes et BY4741  $\text{MATa}$  CFUs diploïdes et haploïdes.

## siRNA et transfections

Les siRNA spécifiques pour l'Atg5 murin (5'-CAUCAACCGGAAACUCAUdTdT-3'), Atg7 murin (5'-AGUUUCCAGUCCGUUGAAdTdT-3'), l'ATG5 humain (5'-CCUUUGGCCUAAGAAGAAAdTdT-3'), l'ATG7 humain (5'-CGACUUGUCCUACGGAAdTdT-3'), BCN1 humain (5'-CAGUGGAUCUAAAUCUCAAdTdT-3'), LAMP 1 humain, (siLAMP1a 5'-CGAGAAAUGCAACACGUUAdTdT-3' ; siLAMP1b, 5'-GGAAUCCAGUUGAAUACAAdTdT-3'), ROCK1 humain (siROCK1a 5'-GCCGCCGGGACCCAACUAUdTdT-3' ; siROCK1b 5'-CAGCCAUCACUAUCAAGAAdTdT-3' ; siROCK1c 5'-GACUAUACAAAACUAUUUdTdT-3'), VAMP1 humain (5'-GGACAUC AUGCGUGUGAAUdTdT-3'), BAX humain (5'-GGGUUUC AUCCAGGAUCGAdTdT-3'), BCAP31 humain (5'-GCGCGAAAUUCGGAAGUAUdTdT-3'), CASP8 humain (5'-CAUCUCAGUUCACUGGUUdTdT-3'), CRT humain (5'-CCGCUGGGUCGAAUCCAAAdTdT-3'), CCL2 humain (5'-GCAGAAGUGGGUUCAGGAUdTdT-3'), CCL5 humain (5'-GGUUCGGGAGUACAUCAACdTdT-3'), CCR2 humain (5'-GUAAUGAUGUCGUUUGAAUdTdT-3'), CCR5 (5'-GUCAGUAUCAAUUCUGGAAdTdT-3'), CXCL8 humain (5'-GCGCCAACACAGAAAUUAUdTdT-3'), CXCL 12 humain (5'-CCAUGUAGAAGCCACUAUdTdT-3'), CXCR1 humain (5'-GCGUCACUUGGUCAAGUUUdTdT-3'), CXCR4 humain (5'-GGAAGCUGUUGGCUGAAAAdTdT-3'), eIF2 $\alpha$  humain (5'-GAAACUGAAAGCAAUCGAAdTdT-3'), PERK humain (5'-CUCACAGGCAAAGGAAGGAGdTdT-3'), SNAP25 humain (5'-CAGGCAUUGCACUAAAAGUdTdT-3'), et également un siRNA contrôle sans rapport avec le génome humain ni avec le génome murin (siUNR, 5'-GCCGGUAUGCCGGUUAAGUdTdT-3') (de La Motte Rouge, Galluzzi et al. 2007) ont tous été commandés chez Sigma-Prologo (Woodlands, TX, USA). De plus, les siRNA commerciaux spécifique pour Bcn1 murin (sc-29798) et pour SLC17A9 humain (plus connu comme VNUT ; sc-72740) ont été commandés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Les siRNAs spécifiques pour Cxcr1 et Cxcr2 ont été commandés chez Dharmacon (Waltham, MA, USA). Les cellules ont été transfectées, une fois que celles-ci aient atteint 30 à 40% de confluence avec les différents siRNAs grâce à l'agent de transfection HiPerfect (Qiagen, Hilden, Allemagne), en suivant les instructions du fabricant, en s'assurant de l'inhibition



du gène d'intérêt par immunoblot. Les transfections transitoires avec les plasmides ont été réalisées en utilisant l'agent de transfection Lipofectamine 2000.

### Screening des siRNA array

Les plaques Bio-one  $\mu$ Clear 284 puits (Greiner Bio One, Kremsmuenster, Autriche) ont été fixées au préalable avec 3.125 ng de siRNAs individuels (Qiagen) ciblant 250 protéines humaines différentes impliquées dans la mort cellulaire et dans la voie de réponse au stress. Le positionnement des siRNAs a été randomisé pour minimiser les effets de l'encombrement stérique. Pour chaque gène, deux siRNAs distincts ont été choisis, vérifiant ainsi expérimentalement les siRNAs qui ont été identifiés par le Centre de Recherche GeneGlobe (Qiagen). Après fixation, les plaques ont été déshydratées, salées et stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les transfections ont été réalisées grâce à l'agent de transfection HiPerfect avec les siRNAs ré-hydratés avec 5  $\mu$ l d'OptiMEM (Life Technologies), en suivant les instructions du fabricant.  $2 \times 10^3$  cellules U2OS co-exprimant stablement H2B-RFP et CRT-GFP ont été mises en plaque dans chaque puit et maintenues en culture pendant 48h avant administration de 1  $\mu$ M de MTX pour une incubation de 4h supplémentaire. Les cellules ont été éventuellement fixées dans 4% de paraformaldéhyde pendant 20 min à température ambiante, lavées et stockées à 4°C. Quatre champs d'images ont été pris par puits grâce à l'utilisation du bioimager automatisé BD Pathway 855 (BD Biosciences) équipé de l'objectif UApo/340 20X/0.75 (Olympus, Center Valley, PA, USA). Les images ont été par la suite segmentées et analysées pour la granularité de GFP, c'est-à-dire l'étude de la redistribution de la protéine de fusion CRT-GFP depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à la périphérie cytoplasmique, *via* l'utilisation du logiciel AttoVision v. 1.7 (BD Biosciences). Finalement, les données ont été évaluées statistiquement grâce au logiciel Prism v. 5 (Graph Pad software Inc., La Jolia, CA, USA).

### Evaluation automatisée de l'autophagie

L'autophagie a été monitorée par microscopie automatisée à fluorescence. Pour ceci,  $5 \times 10^3$  cellules HeLa exprimant GFP-LC3 ont été mises en plaque dans des plaques 96 puits à fond noir (BD Biosciences) et laissées 24h pour leur adhésion. Ces cellules ont ensuite

été traitées pendant 24h supplémentaires soit avec le rCXCL8 à différentes concentrations (40, 80, 160 ou 320 ng/ml), ou soit avec 1  $\mu$ M de rapamycine, puis fixées dans 4% de paraformaldéhyde contenant 1  $\mu$ M de Hoechst 33342 (Life Technologies) pendant 20 min à température ambiante, puis imagées comme décrit précédemment. Le Hoechst 33342 est un marqueur fluorescent spécifique de l'ADN qui se lie au niveau des sillons mineurs des régions double-brins riches en adénine et thymine. Contrairement au DAPI (marquage des cellules nécrosées en se liant aux bases adénine et thymine de l'ADN et émettant une fluorescence bleue) et à l'iodure de propidium (agent intercalant des acides nucléiques émettant une lumière rouge et utilisé comme marqueur des noyaux des cellules ayant perdu l'intégrité de leur membrane plasmique, caractéristique des cellules nécrosées), le Hoechst 33342 permet de marquer également le noyau des cellules vivantes. Les images ont été segmentées et analysées pour le nombre de dots de GFP<sup>+</sup> par cellule grâce au logiciel AttoVision v. 1.7.

#### Expression inductible de la Pannexine 1 tronquée.

La séquence codant la partie entre les acides aminées 1-371 de la Pannexine 1 couplée au Flag (DYKDDDDK) a été amplifiée dans un vecteur pEBB-Flag codant pour la Pannexine 1 (fournit par le Dr Kodi S. Ravichandran, Centre d'immunologie de Arter, Université de Virginie, Charlottesville, VA, USA) obtenue grâce aux primers suivant : 5'-ATGCTAGCATGGCCATCGCTCAACTG-3' et 5'-CAATTTCGAAGTCGGTACCTCACTTGTCATCG-3'. Le produit de la PCR a été digéré avec les enzymes de restriction *Bst*BI et *Nhe*I-HF (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) et inséré ensuite dans pCDH-CuO-MCS-EF1-CymR-T2A-Puro, un vecteur lentiviral inductible (System Biosciences, Mountain View, CA, USA), comprenant un tag hemagglutinine. Les particules pseudo-virales codant pour la tPANX1 ont été produites en suivant les instructions du kit ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Life Technologies). Nous avons infecté les cellules MCA205 avec les vecteurs lentiviraux overnight dans un milieu de culture complet auquel nous avons ajouté 5  $\mu$ g/ml de polybrene. Nous avons ensuite changé le milieu des cellules par du milieu frais sans lentivirus pendant 24h avant d'ajouter 5  $\mu$ g/ml de puromycine comme antibiotique de sélection. Une semaine plus tard, nous avons isolé les clones singulets par un tri avec le

cytomètre FACSVantage (Becton Dickinson, San José, CA, USA), puis amplifiés et criblés pour avoir la forme tPANX1.

### Immunoblotting

Pour pouvoir réaliser les immunoblots, nous avons rincé avec du PBS froid puis lysé environ  $1 \times 10^6$  cellules en suivant les procédures standards. Cinquante microgrammes de protéines ont été séparés en fonction de leur poids moléculaire dans les gels pré-coulés NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% (Life Technologies) puis transférés sur des membranes en nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Les membranes ont été saturées par une incubation pendant 1h dans 0.05% de Tween-20 (v/v dans le TBS) auquel est ajouté 5% de poudre de lait écrémé ou d'albumine de sérum bovin. Les membranes ont été ensuite laissées en incubation une nuit entière à 4°C dans les anticorps primaires spécifiques pour : ATG5 (Sigma-Aldrich), ATG7 (Sigma-Aldrich), BCN1 (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), GAPDH (Millipore, Billerica, MA, USA), LC3B (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), p62 (Abnova, Taipei, Taiwan) ROCK1 (Biosciences, San Diego, CA, USA), VNUT (Santa-Cruz Biotechnology) ou CASP8 (Calbiochem-Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Les quantités de protéines déposées dans chaque puit ont été quantifiées avec la  $\beta$ -actine (Millipore-Chemicon International, Temecula, CA, USA) ou avec la GAPDH (Millipore-Chamicon International). Les anticorps primaires ont été détectés avec les anticorps secondaire appropriés couplés à la peroxydase (Southern Biotechnologies Associates, Birmingham, UK) et révélés à l'aide du logiciel ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) après incubation avec le réactif SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) ou avec l'ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare).

### Expériences de mort cellulaire et de perméabilité membranaire

La mort cellulaire par apoptose a été mesurée par l'exposition à la surface cellulaire de la phosphatidylsérine et par le marqueur de viabilité DAPI. (Galluzzi, Zamzami et al. 2007, Kepp, Galluzzi et al. 2011). Nous avons tout d'abord rincé nos cellules avec du PBS deux fois puis nous les avons resuspendu dans un milieu de marquage 1X supplémenté

du marqueur AnnexinV-PE ou AnnexinV-FITC (fluorescein isothiocyanate) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) et du marqueur DAPI en suivant les instructions du fabricant. Pour mesurer la perméabilisation de la membrane plasmique, les cellules ont été incubées dans le milieu de culture auquel nous avons ajouté 1  $\mu$ M de YO6PRO-1 (Molecular Probes-Life Technologies, Eugene, CA, USA) pendant 30min à 37°C. La cytométrie a été réalisée sur le cytomètre Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) et les données ont été analysées grâce au logiciel Kaluza v. 1.1 (Beckman Coulter) en réglant les paramètres sur les événements présentant un profil WT.

### Marquage de l'ATP intracellulaire

L'ATP vésiculaire a été détectée par microscopie fluorescente et par cytométrie en flux. Pour les expériences de microscopie fluorescente, les cellules ont été marquées avec 5 $\mu$ M de quinacrine dans le milieu Krebs-Ringer (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM de glucose et 25 mM d'HEPES, à un pH de 7.4) pendant 30min à 37°C. Les cellules ont été ensuite marquées pendant 10 min avec 1  $\mu$ g/ml d'iodure de propidium (IP) et 10  $\mu$ M de Hoechst 33342 (les deux proviennent de Molecular Probes-Life Technologies).

Les cellules ont été rincées avec le milieu Krebs-Ringer et observées au microscope confocal SPE équipé de l'objectif Apochromat 63 x 1.3 NA et de l'objectif à immersion d'huile 40 x 1.15 NA (Leica, Wetzlar, Allemagne). Nous avons utilisé le logiciel Image J (disponible gratuitement sur le site <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) pour déterminer les études quantitatives de colocalisation. Le pourcentage de colocalisation entre LAMP1-RFP ou RFP-LC3 avec la quinacrine a été calculé par le logiciel Metamorph v. 6.2r4 (Universal Imaging Corp., Detroit, MI, USA). Pour les expériences de cytométrie en flux, les cellules traitées ont été marquées avec 1  $\mu$ M de quinacrine comme décrit précédemment, puis lavées et resuspendues dans 1  $\mu$ g/ml d'IP ou, de façon alternative, les cellules ont été marquées avec 30  $\mu$ M de BODIPY-FL-ATP (Life Technologies), en suivant les instructions du fabricant. Le colorant BODIPY-FL est à fluorescence verte avec un spectre d'excitation et d'émission similaire à l'Alexa Fluor® 488 ou à la fluorescéine (FITC). Il est relativement insensible à la polarité des solvants et aux variations du pH, ce qui nous a permis de valider nos résultats obtenus avec la

quinacrine. Le BODIPY-FL-ATP est composé du fluorophore BODIPY FL qui va s'attacher en position 2' ou 3' du ribose de l'ATP *via* une molécule liante.

Dans les deux cas, la fluorescence a été mesurée par le cytomètre FACSVantage, les cellules mortes étant exclues (IP<sup>-</sup>), et les résultats ont été analysés par le logiciel CellQuest (Beckton Dickinson).

### Tri cellulaire

Un million cinq cent mille cellules U2OS ont été marquées avec 150 nM de tétraméthylrhodamine méthyl ester (TMRM, de Molecular Probes-Life Technologies) pendant 30min à 37°C, lavées deux fois avec du PBS froid et resuspendues dans le milieu 1X contenant l'Annexin V conjugué au FITC (BD Biosciences) et à 10 µM de DAPI, en suivant les instructions du fabricant. Les cellules ont été ensuite triées en trois sous-populations (DAPI-PS-TMRM<sup>low</sup>; DAPI-PS-TMRM<sup>high</sup>; DAPI-PS<sup>+</sup>TMRM<sup>low</sup>) sur le cytomètre FACVantage. Ces cellules ont été ensuite utilisées pour les expériences de mesure d'ATP intracellulaire ou bien maintenues en culture pendant 60min supplémentaire pour effectuer les expériences de mesure d'ATP extracellulaire.

### Mesure de la libération d'ATP

Les niveaux d'ATP extracellulaire et intracellulaire ont été respectivement mesurés par des kits basés sur la luciférine : ENLITEN ATP Assay (Promega, Madison, WI, USA) et ATP assay (Calbiochem). La chimioluminescence induite est ensuite mesurée par un lecteur de plaque FLUOstar OPTIMA FL (BMG Labtech, Offenburg, Allemagne).

### Quantification extracellulaire de CXCL8 et Cxcl2

La concentration de CXCL8 et Cxcl2 dans le surnageant des cultures cellulaires a été mesurée grâce aux kits ELISA commerciaux (Biolegend, San Diego, CA, USA et R&D Systems), en suivant les instructions du fabricant. L'absorbance a été mesurée par le lecteur de plaque à fluorescence FLUOstar Optima (BMG Labtech).

### Marquages cellulaires

Les cellules ont été cultivées dans des chambres de culture à 8 compartiments fixées sur une lame de microscopie 26 x 76 mm, munies d'un couvercle (NUNC, Roskilde, Denmark). Après changement du milieu, les cellules ont été incubées dans un milieu contenant 500 nM de Mito Tracker, 500 nM d'ER-Tracker, 500 nM de LysoTracker ou alors de 10 µg/ml de DQ Red BSA (tous les marqueurs proviennent de Molecular Probes-Life Technologies) pendant 1h à 37°C. Les cellules ont été ensuite lavées deux fois avec du milieu chauffé, contenant la quinacrine, du Hoechst 33342 puis visualisées en microscopie fluorescente, comme décrit précédemment.

### Analyse de l'exposition à la surface cellulaire de LAMP1

Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS froid, puis incubées pendant 45 min soit avec un anticorps dirigé spécifiquement contre LAMP1, conjugué avec le PE (Biolegend, San Diego, CA, USA), soit avec les anticorps anti-isotypes contrôles (Biolegend) dans du PBS froid auquel nous avons ajouté 3% de sérum fœtal bovin. Après un lavage avec du PBS froid, les échantillons sont marqués avec du DAPI et nous avons analysé la présence de LAMP1 à la surface membranaire des cellules vivantes (DAPI-) sur le cytomètre Gallios. Nous avons analysé les résultats avec le logiciel Kaluza v. 1.1.

### Analyse de l'exposition à la surface cellulaire de PANX1

L'exposition à la surface cellulaire de la PANX1 a été mesurée par microscopie à fluorescence. Pour cela, les cellules ont été mises en culture dans des chambres de culture à 8 compartiments fixées sur une lame de microscopie 26 x 76 mm, munies d'un couvercle. Elles ont été ensuite lavées au PBS, incubées dans un milieu de blocage contenant l'anticorps anti-PANX1 (Abcam, Cambridge, UK) pendant 30 min sur la glace, puis lavées une autre fois et mises en incubation pendant 30 min avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 anti-lapin (life technologies). Les échantillons sont finalement fixés avec 3.7% de paraformaldéhyde et 1 µg/ml de Hoechst 33342 (dilué

dans du PBS). Les lamelles ont été analysées avec le microscope confocal SPE équipé de l'objectif Apochromat x63 1.3 NA et l'objectif à immersion d'huile x 40 1.15 NA.

#### Détermination de l'exposition à la surface de la CRT

L'exposition de la CRT a été mesurée par un marquage immunologique de surface suivi d'une expérience de cytométrie en flux ou de microscopie confocale comme décrite précédemment. En résumé, les cellules sont cultivées sur des supports standard et utilisées une fois à confluence ; elles sont lavées deux fois au PBS et fixées dans 0,25 % de paraformaldéhyde (dilué dans du PBS) pendant 5 min à température ambiante. En parallèle, les cellules mises sur lamelles sont lavées et fixées de façon similaire. Après deux lavages supplémentaires avec du PBS froid, les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-CRT (ab2907, Abcam, Cambridge, UK) dilué dans du tampon de blocage froid (2% de SVF dilué dans du PBS) pendant 30 min sur la glace. Les cellules sont ensuite lavées, et incubées 30 min supplémentaires avec un anticorps anti-lapin AlexaFluor 488 (Life Technologies) dilué dans le tampon de blocage. Pour les études de microscopie à fluorescence, 5 µg/ml de wheat germ agglutinin conjugué avec l'AlexaFluor 633 (Life Technologies) sont ajoutés pour visualiser la membrane plasmique.

La wheat germ agglutinin a tout d'abord été identifiée comme étant une lectine protégeant les germes de blé contre les insectes, levures et bactéries. Elle est aujourd'hui une des lectines les plus utilisées en biologie cellulaire pour marquer la membrane plasmique.

Les échantillons sont finalement lavés avec du PBS froid, incubés avec 1 µg/ml d'IP pendant 5 min, puis soit analysés avec le cytomètre FACScan soit re-fixés dans 3,7% de paraformaldéhyde auquel est ajouté 1 µg/ml de Hoechst 33342 (Life Technologies), mis dans du milieu de montage Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) et analysés en microscopie confocale avec le TCS SPE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne) qui est équipé d'un objectif 63X/1.15 (Olympus). Pour les analyses en cytométrie en flux, les anticorps ciblant les isotypes IgG (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) ont été utilisés comme contrôles, et les analyses statistiques (limitées aux cellules vivantes IP-) ont été réalisées par le logiciel Cell Quest (Galluzzi, Aaronson et al. 2009).

### Microscopie automatisée

Quatre-vingt mille cellules U2OS soit WT, soit CRT-GFP, soit HMGB1-GFP, soit LC3-GFP ont été plaquées dans des plaques 96 puits à fond noir ou à fond blanc, prétraitées avec la poly-L-lysine (BD Biosciences). Ces plaques ont ensuite été traitées avec les composants de la librairie ICCB Known Bioactives (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) ou alors avec la collection US-Drug (Microsource Discovery Systems, Gaylordsville ; CT, USA) à la concentration finale de 30 et 2  $\mu$ M respectivement pendant 2h, suivi d'un traitement avec 4  $\mu$ M de MTX ou d'un volume équivalent de PBS. Vingt-quatre heures plus tard, quatre à neuf vues par puit ont été acquises grâce à BD Pathway 855 Imaging (BD Biosciences) et les images ont ensuite été analysées par le logiciel AttoVision v. 1.6 (BD Biosciences) pour les marquages locaux de LC3-GFP, la granularité de CRT-GFP, de la sécrétion d'ATP, ou alors du relargage de HMGB1-GFP.

### Etudes du transcriptome

Les souris BALB/c et C57Bl/6 ont reçu, en sous-cutané, l'injection de  $5 \times 10^5$  cellules CT26 ou  $2 \times 10^5$  cellules MCA205 respectivement. Quand la taille de la tumeur a atteint entre 40 et 80 mm<sup>2</sup>, les souris sont traitées par l'injection en intra-péritonéal 10 mg/kg d'oxaliplatine, 0,25 mg/kg de cisplatine ou encore 5,17 mg/kg de MTX. L'ARN total provenant des homogénats tumoraux est extrait grâce au kit RNAqueous (Life Technologies) en suivant les instructions du fabricant. La transcription inverse de cinq microgrammes d'ARN de chaque échantillon a été ensuite réalisée en utilisant le kit de transcription inverse High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), en suivant les recommandations du fabricant. Les expériences d'expression géniques ont été réalisées en utilisant le « Mouse Chemokine Gene Set v1.0 custom TaqMan Array Micro Fluidic Card » (Life Technologies) et analysées par le système de détection ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies)

### Expérimentation animale

Toutes les expériences animales ont été approuvées par la comit  e d'éthique locale (CEEa IRCIV/IGR n  26, enregistré avec le Ministère de Recherche Français), en suivant



les directives 63/2010/EU du Parlement Européen et en respectant les instructions de FELASA. (CEEA IRCIV/IGR n°26n enregistré avec le Ministère Français de la Recherche). Les souris BALB/c (CMH de classe I haplotype H-2<sup>d</sup>) et C57Bl/6 (CMH de classe I haplotype H-2<sup>b</sup>) ont été obtenues chez Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) ou chez Harlan (Gannat, France). Elles sont maintenues dans une pièce dont la température est contrôlée, avec des cycles de 12h de lumière suivi de 12h d'obscurité, et elles reçoivent de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Elles ont été utilisées entre six et vingt semaines d'âge et euthanasiées lorsque les tumeurs excédaient 20-25% de la masse corporelle totale de la souris.

### Expériences de vaccination anti-tumorale

Les cellules CT26 ont été traitées avec 2  $\mu$ M de MTX, seul ou après un pré-traitement par 10  $\mu$ M de DIDS, 10  $\mu$ M de SITS, 30  $\mu$ M de Y-27632, 2  $\mu$ M de H-1115 ou alors 50  $\mu$ M de blebbistatine, et injectées 24h plus tard (à  $3 \times 10^6$  dans 200  $\mu$ l de PBS, à un pH de 7,4) en sous-cutanée dans le bas du flanc de souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines. Sept jours plus tard,  $5 \times 10^5$  de cellules CT26 vivantes (dans 200  $\mu$ l de PBS à un pH de 7,4) sont injectées dans le flanc opposé. De façon similaire, les cellules MCA205 sont incubées avec 1  $\mu$ M de MTX (seul ou après traitement des cellules par les différentes drogues) pendant 24h puis inoculées en sous-cutanée ( $3 \times 10^5$  dans 200  $\mu$ l de PBS, à un pH de 7,4) dans le bas du flanc de souris femelles C57Bl/6 âgées de 6 semaines. Sept jours plus tard,  $3 \times 10^4$  de cellules MCA205 non traitées (dans 200  $\mu$ l de PBS à un pH de 7,4) ont été injectées dans le flanc opposé. Dans les deux cas, les souris ont été suivies pour l'apparition de tumeur trois fois par semaine, pendant 60 jours. Dans l'étude de CXCL8,  $3 \times 10^5$  cellules MCA205 ou  $3 \times 10^6$  cellules CT26 mourantes, traitées au préalable avec la MTX, la cisplatine ou la mitomycine c (seul ou en combinaison avec rCXCL8) ont été injectées en sous-cutanée sur le flanc de souris femelles âgées de six semaines C57Bl/6 ou BALB/c respectivement. Sept jours plus tard, les souris C57Bl/6 ou BALB/c sont re-challengées sur le flanc opposé avec l'injection de  $1 \times 10^5$  cellules MCA205 vivantes ou  $5 \times 10^5$  cellules CT26 vivantes respectivement. L'incidence tumorale a été mesurée régulièrement pendant 50 jours.

## Analyses Statistiques

Chaque expérience a été répétée au moins trois fois. Sauf si indiqué, les figures illustrent les données quantitatives d'une expérience représentative (moyenne  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$  échantillons répliqués). Les informations ont été analysées par la moyenne de Prism v. 5.03 (logiciel GraphPad, La Jolia, CA, USA) et Excel 2007 (Microsoft, Rockville, MD, USA). Les différences statistiques significatives ont été réalisées soit par des  $t$ -tests de Student's ou par des tests de Pearson's  $\chi^2$ . Les  $P$ -values  $< 0,05$  sont considérées comme étant statistiquement significatives.

## Résultats

### 1) Identification des mécanismes de libération d'ATP après une chimiothérapie immunogène

Les résultats accumulés à ce jour indiquent que certains agents anti-cancéreux peuvent stimuler de façon active des réponses immunitaires anti-tumorales spécifiques, qui mèneront au succès thérapeutique à long terme (Galluzzi, Senovilla et al. 2012, Kroemer, Galluzzi et al. 2013). La libération d'ATP, qui se fait de manière active, est une des caractéristiques de la mort cellulaire immunogène, comme décrit dans l'introduction. Les résultats préliminaires ont montré une implication de l'autophagie dans la libération d'ATP, mais les mécanismes moléculaires précis par lesquels les inducteurs de mort cellulaire immunogène stimulent la libération active d'ATP restent méconnus. Il est décrit dans la littérature que les canaux pannexine 1 (PANX1), une fois activés par la caspase 3, interviennent également dans la libération d'ATP par les cellules apoptotiques (Chekeni, Elliott et al. 2010, Qu, Misaghi et al. 2011). C'est donc dans ce contexte de connaissances que notre étude a débuté.

Les résultats présentés ci-dessous ont été publiés dans *Cell Death and Differentiation*. L'article s'intitule « Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death ».

Nous avons tout d'abord confirmé l'implication de l'autophagie dans la libération d'ATP sur des cellules d'ostéosarcomes humaines, les U2OS. En effet, il a été montré qu'une inhibition de l'autophagie entravait la libération d'ATP par les U2OS traitées au préalable par la MTX (fig 1e). Un co-traitement des U2OS par l'inhibiteur de l'ecto-ATPase, ARL67156, ne permet pas aux cellules tumorales pré-traitées de retrouver un niveau normal d'ATP extracellulaire, excluant ainsi la possibilité d'une sur-activation de l'ecto-ATPase dans les cellules déficientes en autophagie (fig 1e). D'autre part, un traitement des cellules par l'inhibiteur de caspases à large spectre, le Z-VAD-fmk, inhibe significativement la libération d'ATP (fig 1b). De manière surprenante, un traitement des cellules par des activateurs de l'autophagie mais pas de la mort cellulaire, tels que la rapamycine, la spermidine ou encore le resvératrol, échoue à induire une libération

d'ATP (fig 1 supplémentaire). Ces premiers résultats suggèrent donc que la libération d'ATP se fait, en partie du moins, sous contrôle de la voie des caspases, et que l'autophagie, qui est essentielle, n'est pas suffisante à elle seule pour libérer activement l'ATP après traitement par chimiothérapies immunogènes. Pour connaître plus précisément les voies impliquées dans la libération d'ATP, nous avons réalisé un criblage chimique. Pour cela, nous avons traité les U2OS avec plus de 1530 drogues distinctes proposées par la banque ICCB Known Bioactives Library et par la collection de l'US-Drug, seules ou en combinaison avec la MTX pendant 18h, marquées avec la quinacrine et analysées au microscope automatisé (fig 2a). Ainsi, quatre drogues ont été identifiées comme étant capables d'inhiber la libération d'ATP induite par la MTX (fig 2b) :

- la monensine, qui bloque le trafic intracellulaire et l'exocytose
- la blebbistatine, qui est un inhibiteur de la myosine II, et de ce fait, bloque le bourgeonnement de la membrane cellulaire lors de l'apoptose
- le Y-27632, qui est un inhibiteur de la protéine ROCK1. Ce dernier, après clivage par la caspase-3, va également intervenir dans le bourgeonnement de la cellule apoptotique.
- La méfloquine, qui inhibe les canaux PANX1.

Après identification de ces drogues, nous avons validé *in vitro* leur implication dans la libération d'ATP par des expériences de cytométrie en flux en utilisant la quinacrine et le Bodipy-ATP, qui sont tous deux des marqueurs de l'ATP intracellulaire. Nous avons observé que, aussi bien avec les inhibiteurs pharmacologiques identifiés par le criblage, qu'avec des expériences de transfection par siRNA correspondant aux protéines d'intérêt, nous avons une inhibition dans la libération d'ATP par les U2OS traitées par la MTX (fig 2c et 2e, fig supplémentaires 3 et 5). Ces résultats ont été confirmés ensuite par des mesures d'ATP intracellulaire et extracellulaire en utilisant un kit commercial dont le principe se base sur la luciférase (fig 2d). De manière intéressante, nous avons observé que ces différents inhibiteurs n'agissaient pas sur les autres paramètres de la mort cellulaire immunogène, à savoir l'exposition de la CRT à la surface cellulaire et la libération d'HMGB1 (fig supplémentaire 6). Nous avons ensuite voulu savoir quelles voies étaient impliquées dans la libération d'ATP dépendante de l'autophagie. Nous avons ainsi montré que les inhibiteurs pour ROCK1, PANX1 et pour la myosine II n'ont pas d'impact sur la survenue de l'autophagie, avec ou sans traitement des cellules avec

l'OXA (fig supplémentaire 6), suggérant que ces voies d'action se trouvent en aval de celle-ci. Cependant, l'inhibition d'une de ces voies annule la capacité d'induire une mort cellulaire immunogène à la suite d'un traitement par MTX, comme l'ont montré les expériences de vaccination. En effet, l'injection en sous-cutanée de cellules de carcinome du colon CT26 et de fibrosarcome MCA205 traitées par la MTX confèrent une protection aux souris haplocompatibles BALB/c et C57Bl/6 respectivement, lors de la ré-injection du même type cellulaire une semaine après (Fig supplémentaire 7). Lorsque les cellules CT26 et MCA205 sont traitées par la MTX en présence d'inhibiteurs de ROCK1, PANX1 ou de myosine II, elles deviennent incapables de conférer une protection aux souris lors de la ré-injection (Fig supplémentaire 7).

Comme il est décrit l'importance de l'implication des canaux pannexine 1 dans la libération d'ATP, nous avons étudié cette voie plus précisément. Il a été décrit un panel d'agents chimiothérapeutiques capables d'induire la translocation de la PANX1 à la surface membranaire, le rendant détectable par immunofluorescence. Nous avons ainsi pu observer qu'après chimiothérapie immunogène, contrairement aux cellules non traitées, les U2OS expriment à leur surface la PANX1, mais que cette expression était totalement inhibée par un traitement avec le Z-VAD-fmk (fig 3a et b). Nous avons par la suite pu observer que l'ouverture des canaux pannexine 1 était bien corrélée à une perméabilisation de la cellule sans que celle-ci soit morte. Pour cela, nous avons généré des cellules MCA205 inductibles pour la pannexine 1 (tPANX1), car la translocation de cette dernière est sous le contrôle d'un promoteur activable par l'ajout de cumate (Mullick, Xu et al. 2006). Par des expériences de cytométrie en flux, nous avons observé que l'administration de cumate aux cellules MCA205 inductibles pour la pannexine 1, mais pas aux cellules contrôles, rend les cellules positives pour le marqueur YO-PRO-1, connu pour être un marqueur de petit poids moléculaire et marquant les cellules en apoptose, capable de passer par les canaux pannexine quand ces derniers sont activés.

Ceci n'est pas le cas pour le marqueur de viabilité DAPI (fig 3c). L'influx de YO-PRO-1 dans les MCA205 inductibles pour la pannexine 1 est corrélé à un efflux d'ATP pouvant être inhibé de manière dose-dépendante par la monensine ou par le DIDS (l'acide 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonique), qui est un autre inhibiteur de la pannexine 1 (fig 3d et e). Cependant, le Y-27632, la blebbistatine et le Z-VAD-fmk échouent à inhiber cet influx de YO-PRO-1 et l'efflux d'ATP après l'ajout de cumate sur les cellules MCA205 inductibles pour la pannexine 1, confirmant la spécificité du panel d'inhibiteurs

identifiés. D'autre part, l'autophagie n'influence pas la libération d'ATP par les canaux pannexine 1, puisque la déplétion de l'un des gènes essentiels pour l'autophagie, ATG5, n'affecte en aucun cas la translocation à la surface cellulaire de PANX1 dans les cellules U2OS traitées par chimiothérapie (fig 4a).

De plus, les cellules murines CT26 Bleclin-1 knockdown (BCN1, une autre protéine essentielle pour l'autophagie) ou Atg7 knockdown montrent un profil d'accumulation du YO-PRO-1 tout à fait normal après traitement par l'OXA (fig 4b). Et *vice versa*, l'étude de la distribution de LC3 (marqueur de l'autophagie) après ajout de cumate dans les cellules MCA205 inductibles pour la PANX1 (tPANX1) ne montre pas de changement, mettant ainsi en évidence que l'expression de la pannexine à la surface cellulaire n'induit pas l'autophagie (fig 4c). D'autre part, la déplétion d'ATG5, ATG7 et de Beclin 1 dans les cellules MCA205 tPANX1 n'ont pas d'effet sur l'influx de YO-PRO-1 ni sur l'efflux d'ATP après ajout de cumate (fig 4d et e).

Ces résultats ont été confirmés par des expériences de transfections transitoires sur des U2OS avec un plasmide permettant l'expression de la pannexine 1 tronquée, donc constitutivement active (fig 8 supplémentaire). Ces premiers résultats montrent que les canaux PANX1 sont requis pour une libération d'ATP nécessaire à la mort cellulaire immunogène, mais que cette voie de libération se fait de façon indépendante de l'autophagie.

Pour déterminer quelle est la voie dépendante de l'autophagie, nous avons localisé la distribution intracellulaire de l'ATP. Pour cela, nous avons effectué un co-marquage des cellules U2OS avec la quinacrine et des marqueurs spécifiques des différents compartiments intracellulaires, puis analysé en microscopie confocale dans des conditions contrôles et après traitement par l'OXA. Nous avons observé que seule une minorité de vésicules marquées par la quinacrine co-localisent avec les marqueurs de mitochondries ou du RE, à la fois dans les cellules non traitées et dans les cellules traitées avec l'OXA. Cependant, la quasi-totalité de vésicules marquées par la quinacrine co-localisent avec un marqueur spécifique des lysosomes. Après traitement des cellules avec l'OXA, nous observons une diminution significative de cette co-localisation (fig 5a et b, fig supplémentaire 9), suggérant que les lysosomes ont libéré l'ATP. Une étude plus précise nous a permis de montrer une co-localisation prépondérante dans les cellules U2OS non traitées, entre la quinacrine et la protéine LAMP1 (Lysosomal-Associated Membrane Protein 1) qui est une protéine se trouvant spécifiquement à la membrane

lysosomale. De la même manière qu'avec le marqueur spécifique des lysosomes, la co-localisation entre la quinacrine et LAMP1 diminue lorsque les cellules sont traitées par la MTX ou par l'OXA, mais pas avec la rapamycine (fig 6a et b). De façon concomitante, la MTX, l'OXA ou encore la rapamycine induisent une augmentation de co-localisation entre la quinacrine et LC3, qui est un marqueur des autophagosomes et des autolysosomes (Fig 6c et 6d). Ces résultats montrent qu'après un traitement par les inducteurs de la mort cellulaire immunogène, l'ATP localisé dans les lysosomes est relocalisé dans les autophagosomes et les autolysosomes, de par la fusion des lysosomes avec les phagosomes. Tous ces phénomènes ne se produisent que si l'autophagie est fonctionnelle. En effet, une inhibition de l'autophagie par transfection des U2OS avec le siRNA pour ATG5 fait diminuer de façon significative la co-localisation entre la quinacrine et LAMP1. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle les lysosomes ont besoin des mécanismes de l'autophagie pour préserver l'ATP au sein de leur lumière. Ces résultats suggèrent donc que les lysosomes et les autophago(lyso)somes participent tous deux au trafic et/ou au maintien du stock d'ATP intracellulaire. Pour confirmer cela, nous avons procédé à la déplétion de la protéine LAMP1, qui n'est pas essentielle pour l'autophagie. Nous avons pu observer que cette déplétion abolissait le relargage d'ATP par les cellules U2OS traitées au préalable par la MTX ou par l'OXA (fig 7a à 7c). De plus, le knockdown de la protéine VAMP1 (vesicle-associated membrane protein 1), qui est connu pour avoir un rôle crucial dans l'exocytose, ainsi que le knockdown d'ATG5 et de BCN1 inhibent également le relargage d'ATP (fig 7b). Il est également notable que le traitement des cellules par les inducteurs de mort cellulaire immunogène induit une translocation de la protéine LAMP1 à la membrane plasmique, comme nous avons pu l'observer par microscopie à immunofluorescence. Cette translocation à la surface des cellules vivantes est inhibée par le Z-VAD-fmk, mais pas par les inhibiteurs de ROCK1, tels que Y-27632 et H1152 ou encore la blebbistatine (fig 7d et 7e). De façon surprenante, nous avons observé une diminution significative de l'exposition de LAMP1 à la surface cellulaire des U2OS traitées par l'OXA quand nous inactivons PANX1 par un knockdown. Cette diminution n'est cependant pas observée lorsque nous réalisons un knockdown de ROCK1, ATG5, ATG7 ou BCN1 (fig 7f). Et *vice versa*, la déplétion de LAMP1 inhibe la translocation de PANX1 à la membrane plasmique des U2OS traitées par l'OXA (fig 7g). Ces résultats montrent un lien encore inconnu entre l'activation des canaux pannexine et le trafic lysosomal.

Ces résultats suggèrent que le pool intracellulaire de l'ATP est partagé entre les lysosomes et les autolysosomes, et de plus, la protéine LAMP1 posséderait un rôle essentiel dans la sécrétion d'ATP liée à la mort cellulaire immunogène, et agirait de façon dépendante des caspases et de la translocation de la PANX1 à la surface cellulaire.



# Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death

I Martins<sup>1,2,3</sup>, Y Wang<sup>1,2,3</sup>, M Michaud<sup>1,2,3</sup>, Y Ma<sup>1,2,3</sup>, AQ Sukkurwala<sup>1,2,3</sup>, S Shen<sup>1,2,3</sup>, O Kepp<sup>1,2,3</sup>, D Métivier<sup>1,2,3</sup>, L Galluzzi<sup>2,4,5</sup>, J-L Perfettini<sup>1,2,3</sup>, L Zitvogel<sup>2,3,6,7</sup> and G Kroemer<sup>\*,1,4,5,8,9</sup>

The immunogenic demise of cancer cells can be induced by various chemotherapeutics, such as anthracyclines and oxaliplatin, and provokes an immune response against tumor-associated antigens. Thus, immunogenic cell death (ICD)-inducing antineoplastic agents stimulate a tumor-specific immune response that determines the long-term success of therapy. The release of ATP from dying cells constitutes one of the three major hallmarks of ICD and occurs independently of the two others, namely, the pre-apoptotic exposure of calreticulin on the cell surface and the postmortem release of high-mobility group box 1 (HMGB1) into the extracellular space. Pre-mortem autophagy is known to be required for the ICD-associated secretion of ATP, implying that autophagy-deficient cancer cells fail to elicit therapy-relevant immune responses *in vivo*. However, the precise molecular mechanisms whereby ATP is actively secreted in the course of ICD remain elusive. Using a combination of pharmacological screens, silencing experiments and techniques to monitor the subcellular localization of ATP, we show here that, in response to ICD inducers, ATP redistributes from lysosomes to autolysosomes and is secreted by a mechanism that requires the lysosomal protein LAMP1, which translocates to the plasma membrane in a strictly caspase-dependent manner. The secretion of ATP additionally involves the caspase-dependent activation of Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1)-mediated, myosin II-dependent cellular blebbing, as well as the opening of pannexin 1 (PANX1) channels, which is also triggered by caspases. Of note, although autophagy and LAMP1 fail to influence PANX1 channel opening, PANX1 is required for the ICD-associated translocation of LAMP1 to the plasma membrane. Altogether, these findings suggest that caspase- and PANX1-dependent lysosomal exocytosis has an essential role in ATP release as triggered by immunogenic chemotherapy.

Cell Death and Differentiation (2014) 21, 79–91; doi:10.1038/cdd.2013.75; published online 12 July 2013

The field of anticancer therapy has recently witnessed a significant paradigm shift. For a long time, cytotoxic anti-neoplastic agents were assumed to mediate therapeutic effects owing to their capacity to directly kill malignant cells or to induce their senescence. Accumulating evidence now indicates that (at least some) anticancer agents actively stimulate tumor-specific immune responses, which in many cases account for long-term therapeutic successes.<sup>1–4</sup> Chemotherapy (as well as some forms of radiotherapy) can exert immunostimulatory effects via two alternative, although non-exclusive, mechanisms. First, some cytotoxic anticancer agents, including anthracyclines and oxaliplatin (OXA), are capable of triggering an immunogenic variant of apoptosis known as immunogenic cell death (ICD),<sup>5,6</sup> *de facto* converting dying cancer cells into a therapeutic vaccine.<sup>7,8</sup> Second, multiple chemotherapeutics can directly stimulate antitumor

immunity,<sup>1,4</sup> either by potentiating the activity of immune effectors (e.g., vinca alkaloids have been shown to promote the maturation of dendritic cells (DCs)) or by antagonizing immunosuppressive cells (e.g., cyclophosphamide reportedly depletes/inhibits regulatory T cells).<sup>9,10</sup>

ICD has been operatively defined as a cell death modality that elicits a protective immune response against dead-cell antigens, implying that the immunogenicity of cell death can be monitored in appropriate vaccination assays.<sup>2,11,12</sup> Thus, the subcutaneous injection of cancer cells that are succumbing to ICD, but not of cells undergoing conventional apoptosis or necrosis, elicits a T-cell-mediated immune response protecting histocompatible mice against a subsequent challenge with tumor cells of the same type.<sup>2,3,13</sup> Of note, most inducers of apoptosis and necrosis fail to trigger ICD. However, a few chemotherapeutics, including

<sup>1</sup>INSERM, U848, F-94805 Villejuif, France; <sup>2</sup>Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France; <sup>3</sup>Université Paris Sud/Paris XI, F-94270 Le Kremlin Bicêtre, France; <sup>4</sup>Université Paris Descartes/Paris V, Sorbonne Paris Cité, F-75006 Paris, France; <sup>5</sup>Equipe 11 labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France; <sup>6</sup>INSERM, U1015 labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, F-94805 Villejuif, France; <sup>7</sup>Center of Clinical Investigations CBT507, Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France; <sup>8</sup>Metabolomic and Cell Biology Platforms, Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France and <sup>9</sup>Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, F-75015 Paris, France

\*Corresponding author: G Kroemer, INSERM U848, Institut Gustave Roussy, 114, rue Edouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France. Tel: +33 1 4211 6046; Fax: +33 1 4211 6047; E-mail: kroemer@orange.fr

**Keywords:** apoptosis; Beclin 1; caspases; endoplasmic reticulum stress; quinacrine; U2OS cells

**Abbreviations:** BCN1, Beclin 1; CRT, calreticulin;  $\Delta\psi_m$ , mitochondrial transmembrane potential; DIDS, 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid; HMGB1, high-mobility group box 1; ICD, immunogenic cell death; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GFP, green fluorescent protein; MTX, mitoxantrone; PANX1, pannexin 1; PE, phycoerythrin; PI, propidium iodide; PS, phosphatidylserine; RFP, red fluorescent protein; ROCK1, Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1; siRNA, small-interfering RNA; SITS, 4-acetamido-4-isothiocyano-stilbene-2,2-disulfonic acid; SNARE, SNAP receptor; TMRM, tetramethylrhodamine methyl ester; tPANX1, truncated PANX1; VAMP1, vesicle-associated membrane protein 1; VNUT, vesicular nucleotide transporter

Received 8.2.13; revised 29.5.13; accepted 31.5.13; Edited by M Piacentini; published online 12.7.13

anthracyclines,<sup>7,8</sup> OXA,<sup>14</sup> cyclophosphamide,<sup>15</sup> and – to some extent – microtubular inhibitors,<sup>16</sup> as well as cardiac glycosides,<sup>17–19</sup> potentially do so.<sup>20,21</sup> Such chemicals appear to be particularly efficient at inducing a pre-mortem endoplasmic reticulum (ER) stress response and autophagy. ER stress culminates in the translocation of the ER chaperone calreticulin (CRT) to the cell surface, thereby generating an ‘eat-me’ signal for DCs.<sup>3,22</sup> Autophagy facilitates the release of ATP from dying cells,<sup>23</sup> constituting both a ‘find-me’ signal for the recruitment of DCs and their precursors<sup>24</sup> and a pro-inflammatory stimulus that – upon binding to the purinergic receptor P2RX7 – elicits the activation of the NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome within DCs and macrophages.<sup>25,26</sup> In addition, ICD is associated with the postmortem release of the non-histone chromatin-binding protein high-mobility group box 1 (HMGB1) into the extracellular space, allowing HMGB1 to bind Toll-like receptor 4 on DCs and thus stimulate their antigen-presenting functions.<sup>2,27</sup>

CRT exposure, ATP secretion and HMGB1 release are all indispensable for ICD, meaning that the absence of one single of these ICD hallmarks abolishes the efficacy of anthracycline- or OXA-based chemotherapy in mouse models.<sup>2</sup> For example, the transgene-driven overexpression of the ectonucleotidase CD39, which converts extracellular ATP into ADP and AMP, by tumor cells is sufficient to compromise the therapeutic effects of ICD-inducing antineoplastic agents *in vivo*.<sup>28</sup> Along similar lines, the stable knockdown of essential autophagic factors such as ATG5 and ATG7, which inhibits ATP secretion from dying tumor cells, allows for the generation of neoplastic lesions that fail to respond to ICD inducers.<sup>23</sup>

The precise molecular mechanisms whereby ICD inducers stimulate the active secretion of ATP by dying cells are elusive. Malignant cells secrete ATP in response to a large panel of cytotoxic therapeutics,<sup>23,29</sup> and this phenomenon obligatorily involves the pre-mortem activation of the autophagic machinery.<sup>23</sup> Although the induction of autophagy alone (in the absence of cell death) may result *per se* in the secretion of ATP,<sup>30</sup> significantly higher extracellular ATP levels are achieved when autophagy and cell death concur.<sup>23,25</sup> Pannexin 1 (PANX1) channels are known to have a prominent role in the release of ATP from apoptotic cells. Indeed, caspase 3, which is a major factor in the execution of apoptotic cell death,<sup>5,6</sup> cleaves PANX1 at its C-terminal auto-inhibitory domain, thereby generating a truncated form of the protein (tPANX1) that operates as a constitutively active channel.<sup>31</sup> In line with this notion, the pharmacological inhibition of caspases, the knockout of *Panx1*, the depletion of PANX1 as well as the substitution of PANX1 by a non-cleavable variant all abolish apoptosis-associated ATP release.<sup>32–34</sup> Moreover, caspase activation and PANX1 expression are both required for the partial, apoptotic increase in the permeability of the plasma membrane to small solutes that precedes the complete, post-apoptotic (necrotic) plasma membrane breakdown.<sup>32–34</sup> In a cell death-unrelated setting, astrocytes have been reported to secrete ATP by lysosomal exocytosis, a process in which lysosomes fuse with the plasma membrane to release their luminal content into the extracellular space.<sup>35</sup>

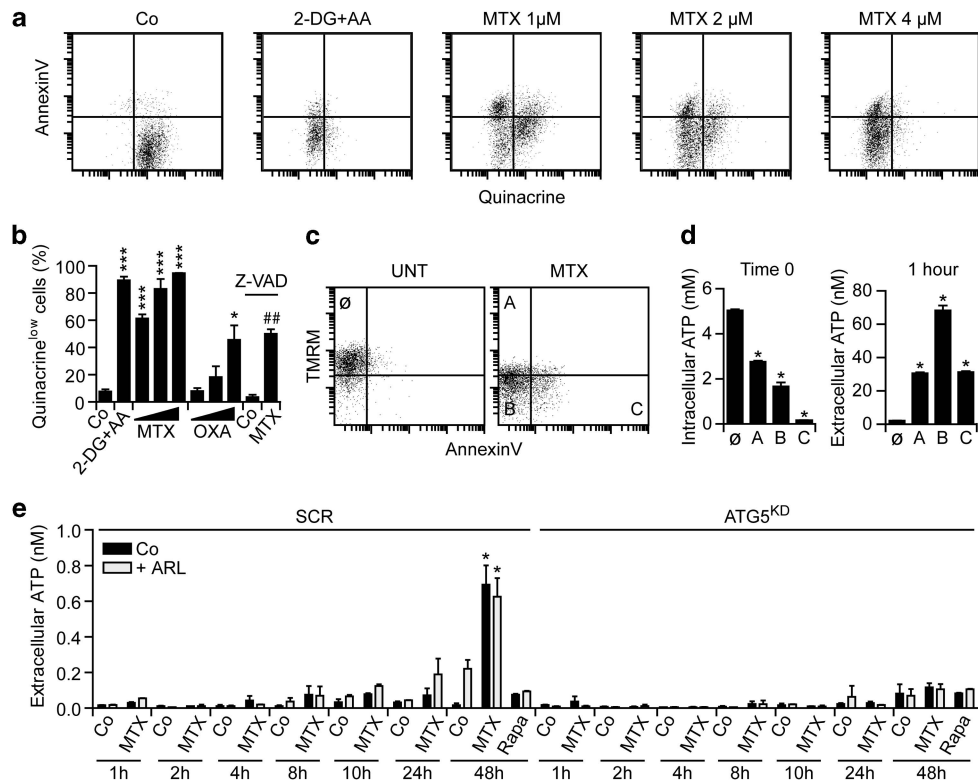
Driven by these premises and incognita, we decided to characterize the mechanisms through which cancer cells extrude ATP in response to chemotherapeutic agents. Here, we demonstrate that the secretion of ATP by dying cancer cells obligatorily involves multiple signal transduction pathways that are articulated in a complex manner.

## Results

**Involvement of autophagy and caspases in ICD-associated ATP secretion.** Live human osteosarcoma U2OS cells maintained in control conditions and stained with the ATP-sensitive fluorochrome quinacrine, which is usually employed for the detection of intracellular ATP-containing vesicles,<sup>36</sup> exhibit a green fluorescence that can readily be monitored by cytofluorometry. This signal is significantly reduced when U2OS cells are co-treated with 2-deoxyglucose (an inhibitor of glycolysis) and antimycin A (which blocks mitochondrial respiration at the level of complex III; Figure 1a), reflecting a significant depletion of intracellular ATP stores. Chemotherapeutics such as mitoxantrone (MTX) and OXA induced a dose-dependent reduction in the amount of ATP that was detectable with quinacrine in viable (4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)<sup>–</sup>) U2OS cells, even before they exposed phosphatidylserine (PS) on their surface and thus became able to bind phycoerythrin (PE)-conjugated AnnexinV (Figures 1a and b). The co-staining of MTX-treated U2OS cells with a mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ )-sensitive probe and PE-conjugated AnnexinV confirmed that intracellular ATP levels drop along with the induction of apoptosis and that cells that exhibit a reduced  $\Delta\psi_m$ , but have not yet exposed PS, are particularly prone to secrete ATP into the extracellular milieu when re-placed in culture (Figures 1c and d). Of note, MTX-induced ATP depletion was strongly inhibited by the broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk (Figure 1b). In line with previous reports,<sup>23,37</sup> autophagy inhibition also compromised the ability of U2OS cells to secrete ATP (Figure 1e), but not to die (Supplementary Figure 1), in response to MTX. The inhibition of autophagy blocked ATP secretion by MTX-treated cells both in the absence and presence of the ecto-ATPase inhibitor ARL67156, excluding the possibility that the overexpression of ecto-ATPases by autophagy-deficient cells would account for these observations (Figure 1e). Of note, autophagy inhibition was not accompanied by a reduction of intracellular ATP levels in baseline conditions (Supplementary Figure 2). Moreover, rapamycin, spermidine and resveratrol, which potentially stimulate autophagy but fail to induce cell death (Supplementary Figure 1 and data not shown), were all unable to induce significant ATP secretion (Figure 1e and data not shown).

Taken together, these results indicate that autophagy is required – but not sufficient – for the ICD-associated release of ATP. Rather, it appears that only the combination of autophagy and apoptosis-related processes (such as caspase activation) allows for ATP secretion in the course of ICD.

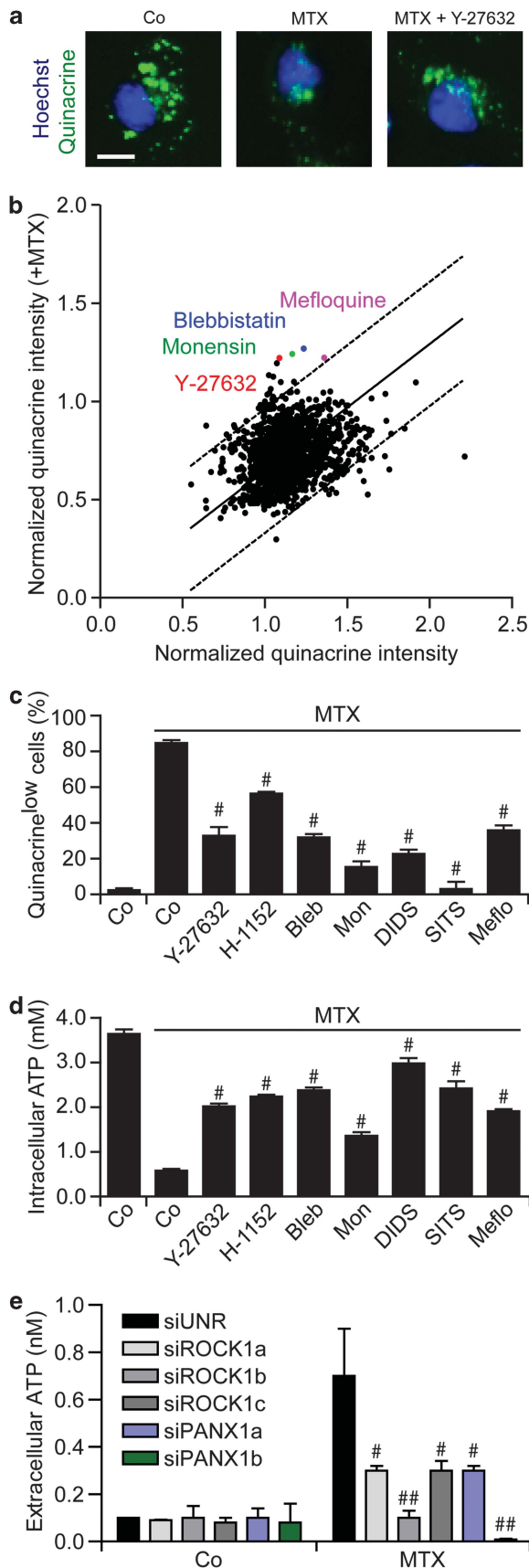
**Involvement of Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1) and PANX1 channels in ICD-associated ATP release.** To gain further insights into the mechanisms whereby some (but not all) chemo-



**Figure 1** Intra- and extracellular ATP levels in the course of immunogenic cell death. **(a and b)** Human osteosarcoma U2OS cells were maintained in control conditions (Co) or treated with 30 mM 2-deoxyglucose (2-DG), 2  $\mu$ g/ml antimycin A (AA), 150, 300 or 600  $\mu$ M oxaliplatin (OXA) or 1, 2 or 4  $\mu$ M mitoxantrone (MTX, 4  $\mu$ M when not otherwise indicated), alone or combined with 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk (Z-VAD) for 24 h, and then co-stained for the cytofluorometric detection of intracellular ATP (with quinacrine, green fluorescence) and phosphatidylserine exposure (with PE-conjugated AnnexinV, red fluorescence). Representative dot plots and quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Student's *t*-test), as compared with cells maintained in Co conditions; ## $P < 0.01$  (Student's *t*-test), as compared with cells treated with 4  $\mu$ M MTX only. **(c and d)** U2OS cells were maintained in Co conditions or treated with 4  $\mu$ M MTX for 18 h, and then co-stained for the cytofluorometric detection of plasma membrane integrity (with DAPI, blue fluorescence), mitochondrial transmembrane potential (with TMRM, red fluorescence) and phosphatidylserine exposure (with FITC-conjugated AnnexinV, green fluorescence). DAPI<sup>+</sup> cells were then sorted according to TMRM and FITC signals, as indicated (c) and either immediately lysed for the assessment of intracellular ATP levels or re-placed in culture for 1 h, followed by the quantification of ATP secretion in culture supernatants (d). Representative dot plots and quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported. \* $P < 0.05$  (Student's *t*-test) as compared with cells in gate Ø. **(e)** Murine fibrosarcoma MCA205 cells stably transfected with either a scrambled (SCR) or an Atg5-targeting shRNA (Atg5<sup>KD</sup>) were maintained in Co conditions or treated with 4  $\mu$ M MTX alone or in combination with 3  $\mu$ M ARL67156 (ARL) for the indicated time, followed by the assessment of ATP secretion into culture supernatants. Quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported. \* $P < 0.05$  (Student's *t*-test) as compared with cells maintained in Co conditions or treated with ARL only for 48 h

therapeutics induce the release of ATP by cancer cells as they kill them, we performed a chemical screen. Thus, U2OS cells were treated with 1530 distinct chemicals from the ICCB Known Bioactives Library or the US-Drug Collection (encompassing most US Food and Drug Administration-approved and some experimental drugs), alone or in combination with MTX, for 18 h, stained with quinacrine and then analyzed by automated, quantitative epifluorescence microscopy (Figure 2a). This screen led to the identification of several compounds that are capable of preventing the MTX-triggered loss of quinacrine-dependent fluorescence (Figure 2b): monensin, which blocks intracellular trafficking and exocytosis;<sup>38</sup> blebbistatin, which inhibits myosin II, thereby blocking the apoptosis-associated blebbing of the plasma membrane;<sup>39</sup> Y-27632, which inhibits ROCK1,<sup>40</sup> a protein that – upon cleavage by caspase-3 – participates in apoptotic blebbing;<sup>41,42</sup> and mefloquine, which inhibits PANX1 channels.<sup>43</sup> Subsequent validation experiments confirmed that monensin, blebbistatin and several chemically-unrelated

inhibitors of ROCK1 (i.e., Y-27632, bearing with a central aminoethyl group, and H-1152, characterized by a central sulfonyl junction) and PANX1 (i.e., the synthetic quinine analogue mefloquine and the disulfonic stilbene derivatives 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) and 4-acetamido-4-isothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS)) blunt the loss of quinacrine fluorescence as triggered in U2OS cells by MTX (Figure 2c). Similar results were obtained when intracellular ATP levels were measured by means of a commercial, luciferase-based kit (Figure 2d) as well as by an alternative ATP-sensitive fluorochrome, Bodipy-ATP<sup>38</sup> (Supplementary Figure 3). In addition, the ICD-associated release of ATP was inhibited by a panel of distinct pannexin (and connexin) inhibitors (Supplementary Figure 4). Finally, the small-interfering RNA (siRNA)-mediated depletion of ROCK1 or PANX1 as well as that of SLC17A9, a protein involved in the exocytosis of ATP-containing vesicles (also known as vesicular nucleotide transporter, VNUT),<sup>44</sup> inhibited ATP secretion by U2OS cells



responding to MTX (Figure 2e, Supplementary Figure 5), confirming the results obtained with pharmacological inhibitors.

Although pharmacological inhibitors of ROCK1, PAXX1 or myosin II interfered with ATP release as induced by OXA, they failed to prevent OXA-triggered apoptosis and were unable to interfere with the pre-apoptotic exposure of CRT on the cell surface and the post-apoptotic release of HGMB1 associated with ICD (Supplementary Figure 6). Moreover, ROCK1, PAXX1 and myosin II inhibitors failed to alter autophagy, both in baseline conditions and following the administration of OXA (Supplementary Figure 6), suggesting that these factors act downstream of autophagy to mediate the ICD-associated release of ATP. Importantly, the inhibition of ROCK1, PAXX1 or myosin II suppressed the capacity of MTX to elicit ICD, as evaluated in vaccination experiments. Thus, the subcutaneous administration of CT26 colon carcinoma and MCA205 fibrosarcoma cells treated with MTX alone did protect haplocompatible BALB/c and C57Bl/6 mice, respectively, against a subsequent challenge with live tumor cells of the same type (Supplementary Figure 7). However, CT26 and MCA205 cells succumbing to MTX in the presence of ROCK1, PAXX1 or myosin II inhibitors became unable to successfully vaccinate mice against cancer (Supplementary Figure 7).

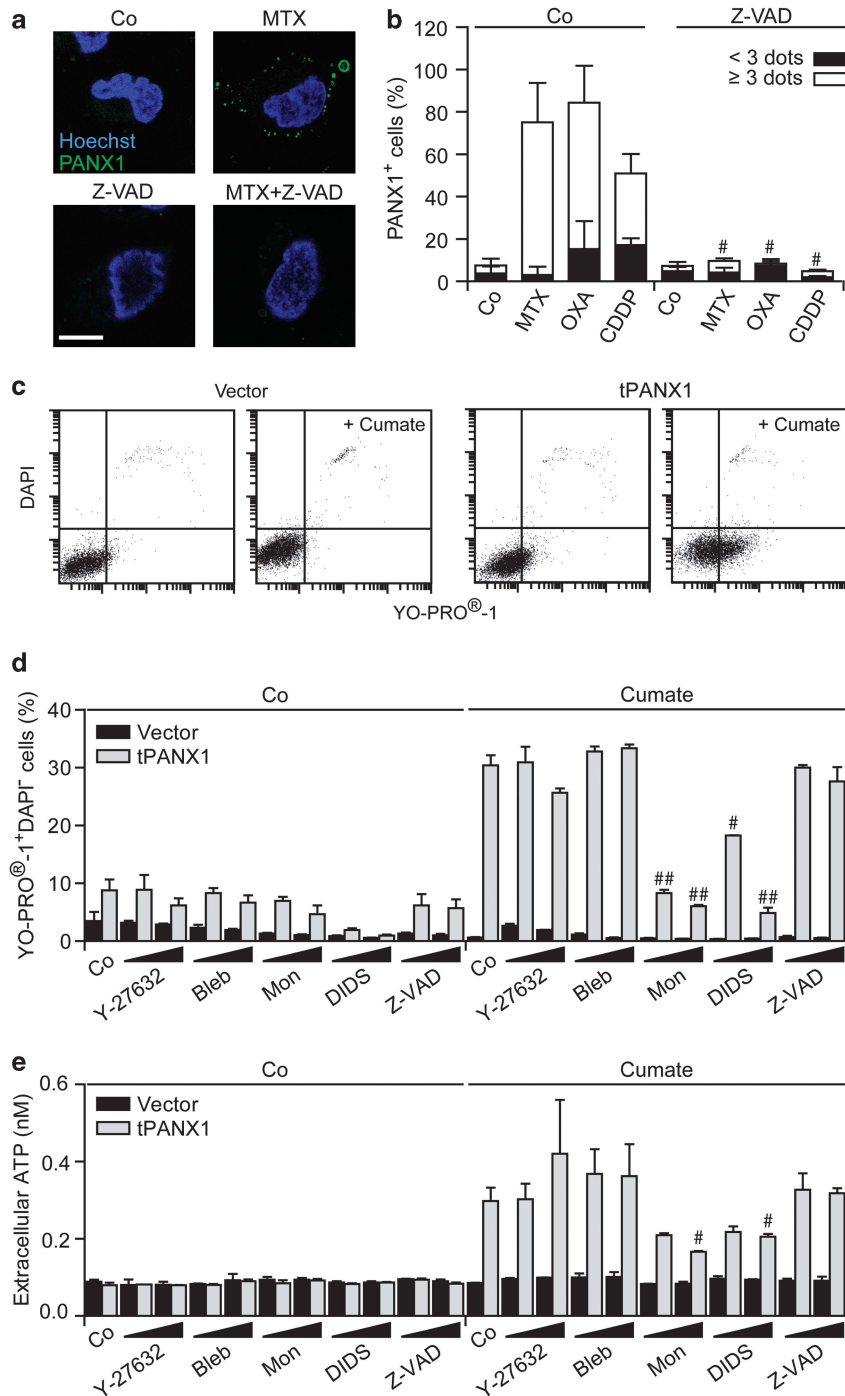
Collectively, these data point to an essential role for both apoptotic blebbing (which depends on ROCK1 and myosin II) and PAXX1 channels in ICD-associated ATP release.

#### PAXX1 channels operate independently from autophagy.

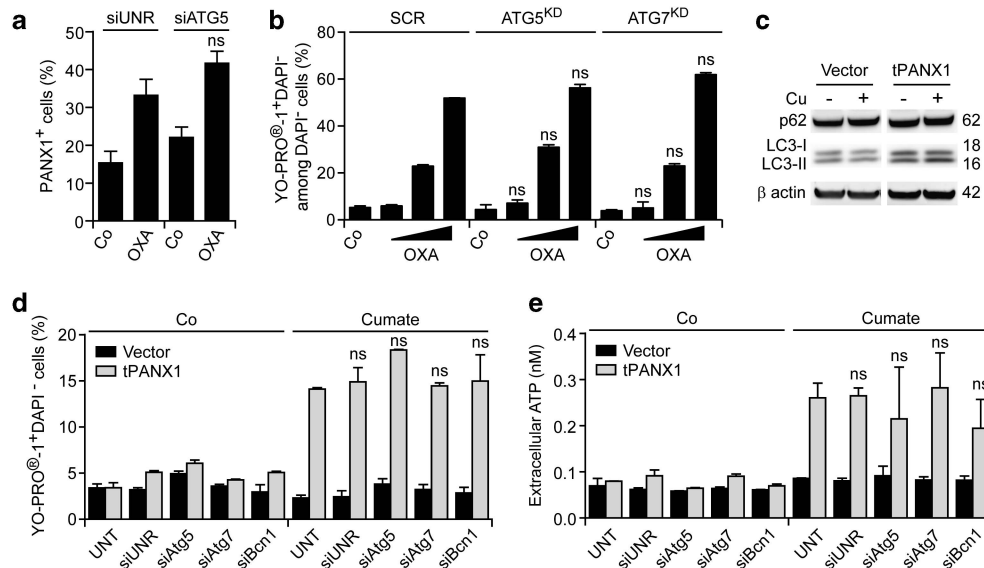
A panel of distinct chemotherapeutic agents provoked the translocation of PAXX1 to the outer leaflet of the plasma membrane, rendering it detectable by immunofluorescence microscopy upon cell surface staining. Thus, although untreated U2OS cells failed to stain positively for cell surface PAXX1, chemotherapy-treated cells exhibited a punctuate PAXX1-specific staining, a phenomenon that was completely suppressed by Z-VAD-fmk (Figures 3a and b). Next, we generated MCA205 cells that express tPAXX1 under the control of the

**Figure 2** Chemical library screen for the identification of ATP release inhibitors. (a and b) Human osteosarcoma U2OS cells were treated with 1530 compounds from the ICCB Known Bioactives Library (final concentration 30  $\mu$ M) or the US-Drug collection (final concentration 1  $\mu$ M), alone or combined with 4  $\mu$ M mitoxantrone (MTX), for 18 h, and then stained for the fluorescence microscopy-assisted detection of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence) and ATP-containing vesicles (with quinacrine, green fluorescence). Representative images (scale bar = 10  $\mu$ m) and quantitative data are reported. Each dot represents the normalized mean quinacrine fluorescence associated with one compound alone (x axis) and combined with MTX (y axis). (c and d) U2OS cells were maintained in control (Co) conditions or treated with 60  $\mu$ M Y-27632, 2  $\mu$ M H-1152, 25  $\mu$ M blebbistatin (Bleb), 5  $\mu$ M monensin (Mon), 10  $\mu$ M 4,4'-diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS), 10  $\mu$ M 4-acetamido-4-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS) and 10  $\mu$ M mefloquine (Meflo), alone or combined with 4  $\mu$ M MTX, for 18 h, and then stained for the cytofluorometric (c) or luminometric (d) quantification of ATP levels. Quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ ) are reported. \* $P<0.05$  (Student's *t*-test) as compared with cells treated with MTX only. (e) U2OS cells were transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with the indicated siRNAs for 48 h, and then maintained in Co conditions or treated with 4  $\mu$ M MTX for additional 18 h. Eventually, ATP release in culture supernatants was monitored by a luciferase-based test. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  (Student's *t*-test) as compared with siUNR-transfected cells treated with MTX only





**Figure 3** ATP release through PANX1 channels. **(a and b)** Human osteosarcoma U2OS cells were maintained in control conditions (Co) or treated with 2  $\mu$ M mitoxantrone (MTX), 300  $\mu$ M oxaliplatin (OXA) and 75  $\mu$ M cisplatin (CDDP), alone or in combination with 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk (Z-VAD-fmk), for 18 h, and stained for the fluorescence microscopy-assisted detection of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence) and PANX1 at the cell surface (green fluorescence). Representative images (scale bar = 10  $\mu$ m) and the % of cells exhibiting < 3 or  $\geq$  3 PANX1 dots are reported (means  $\pm$  S.E.M.,  $n > 100$  cells).  $^{\#}P < 0.05$  (Student's *t*-test) as compared with cells treated with MTX, OXA or CDDP only. **(c–e)** Murine fibrosarcoma MCA205 cells stably transfected with a construct coding for truncated PANX1 (tPANX1) under the control of a cumate-inducible promoter or with the corresponding empty vector were maintained in Co conditions or treated with 15 or 30  $\mu$ M Y-27632, 5 or 10  $\mu$ M blebbistatin (Bleb), 2.5 or 5  $\mu$ M monensin (Mon), 5 or 10  $\mu$ M 4,4'-diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) or 25 or 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk (Z-VAD) for 4 h, and then exposed or not to cumate for additional 48 h. Finally, cells were processed for the cytofluorometric detection of YO-PRO-1 and DAPI uptake **(c and d)** and ATP concentration in supernatants was assayed by a luciferase-based assay **(e)**. Representative dot plots and quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported.  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$  (Student's *t*-test) as compared with cells treated with cumate only



**Figure 4** Autophagy-independent ATP release through PANX1 channels. **(a)** Human osteosarcoma U2OS cells were transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with a siRNA specific for ATG5 for 48 h, then maintained in control (Co) conditions or treated with 300  $\mu$ M oxaliplatin (OXA) for additional 18 h. Finally, cells were processed for the immunofluorescence microscopy-assisted detection of PANX1 at the cell surface. The percentage of cells exhibiting  $\geq 3$  PANX1 dots are reported (means  $\pm$  S.E.M.,  $n > 100$  cells). ns, non-significant (Student's *t*-test) as compared with siUNR-transfected, OXA-treated cells. **(b)** Murine fibrosarcoma MCA205 cells stably transfected with either a scrambled (SCR) shRNA or shRNAs targeting Atg5 (Atg5<sup>KD</sup>) or Atg7 (Atg7<sup>KD</sup>) were maintained in Co conditions or treated with 75, 150 or 300  $\mu$ M OXA for 18 h, followed by the cytofluorometric detection of YO-PRO-1 and DAPI uptake. Quantitative data are reported (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ). ns, non-significant (Student's *t* test) as compared with equally treated SCR cells. **(c)** Murine fibrosarcoma MCA205 cells stably transfected with a construct coding for truncated PANX1 (tPANX1) under the control of a cumate-inducible promoter or with the corresponding empty vector were treated or not with cumate (Cu) for 48 h, followed by the immunoblotting-assisted detection of the indicated autophagic markers.  $\beta$ -actin levels were monitored to ensure equal lane loading. **(d and e)** MCA205 cells stably transfected with a plasmid-encoding tPANX1 or the corresponding empty vector were left untransfected (UNT) or transiently transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with the indicated autophagy-modulatory siRNAs for 48 h, and then exposed or not to cumate for additional 48 h. Eventually, cells were subjected to the cytofluorometric detection of YO-PRO-1 and DAPI uptake, whereas ATP levels in culture supernatants were quantified by means of a luciferase-based assay. Quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported. ns, non-significant (Student's *t*-test) as compared with UNT cells treated with cumate only

cumate-inducible promoter.<sup>45</sup> The administration of cumate to tPANX1-transfected, but not to control, MCA205 cells rendered them permeable to the small fluorescent dye YO-PRO-1, but not to the vital dye DAPI (Figure 3c), in line with the previously reported capacity of tPANX1 to promote a selective permeabilization of the plasma membrane.<sup>32–34</sup> The expression of tPANX1 drove a YO-PRO-1 influx coupled to an ATP efflux that could be inhibited in a dose-dependent manner by monensin and DIDS but not by Y-27632, blebbistatin and Z-VAD-fmk (Figures 3d and e), confirming the specificity of this panel of inhibitors.

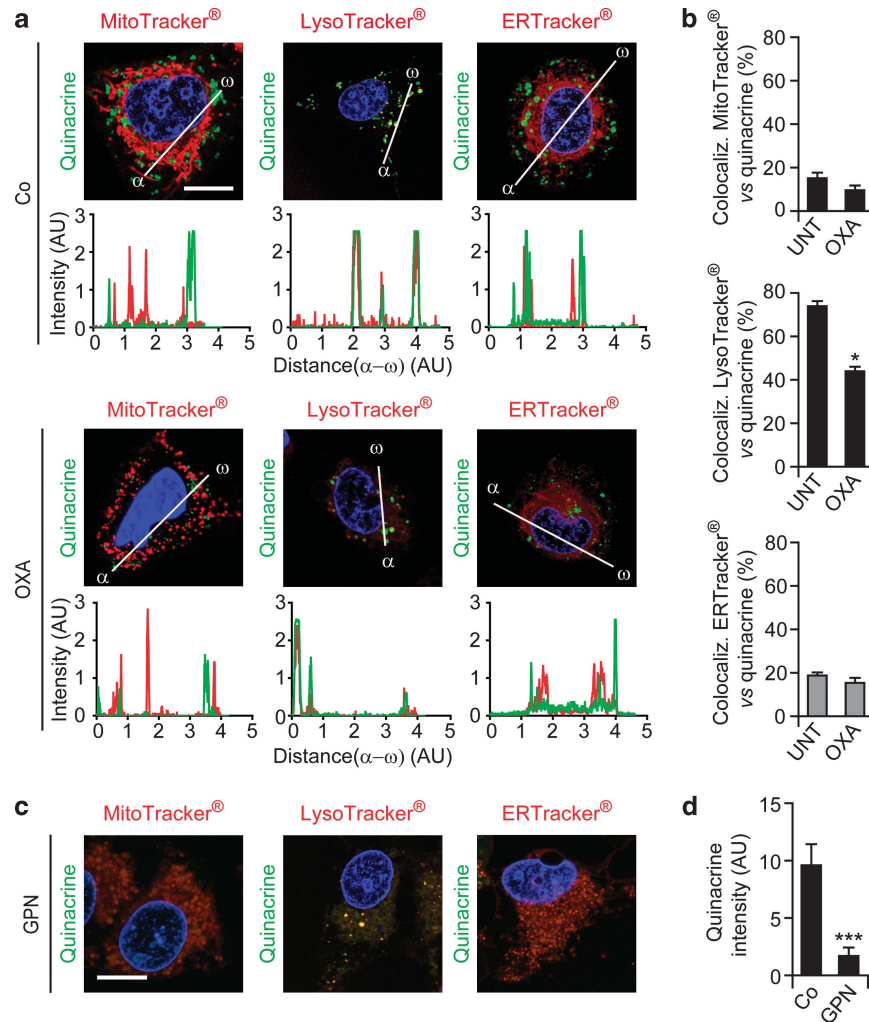
The depletion of the essential autophagic factor ATG5 failed to affect the translocation of endogenous PANX1 to the surface of chemotherapy-treated U2OS cells (Figure 4a). Along with similar lines, CT26 cells stably depleted of Atg5 or Atg7 normally accumulated YO-PRO-1 upon exposure to OXA *in vitro* (Figure 4b). The expression of tPANX1 as triggered by cumate did not stimulate autophagy, as evaluated by the electrophoretic mobility of the autophagic factor LC3<sup>46</sup> (Figure 4c) and by assessing the redistribution of a green fluorescent protein (GFP)-LC3 chimera into cytoplasmic dots (data not shown). Moreover, the depletion of ATG5, ATG7 and Beclin 1 (BCN1, another protein with a prominent role in autophagy) failed to affect YO-PRO-1 influx into and ATP efflux from MCA205 cells expressing tPANX1 in response to cumate (Figures 4d and e). Similarly, genetic inhibition of autophagy did not prevent the influx of

YO-PRO-1 and the secretion of ATP as triggered in U2OS cells by the constitutive overexpression of tPANX1 (Supplementary Figure 8). Thus, there is no direct cause-effect relationship between the opening of PANX1 channels and autophagy.

Altogether, these results indicate that PANX1 channels, which are required for ICD, mediate ATP secretion in an autophagy-independent manner.

#### Essential role for LAMP1 in ICD-associated ATP release.

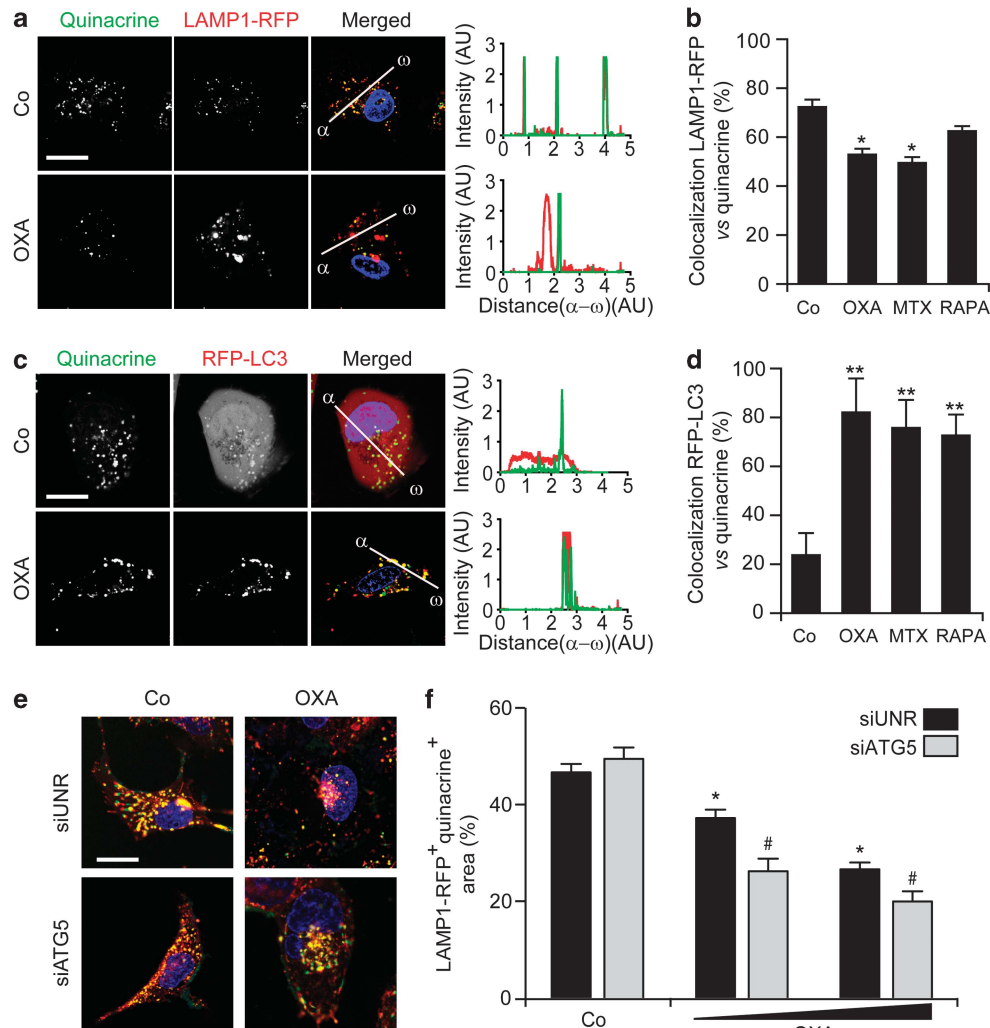
To gain further insights into the autophagy-dependent mechanisms accounting for the ICD-associated secretion of ATP, we monitored the subcellular localization of ATP. To this aim, U2OS cells were co-stained with the ATP-sensitive dye quinacrine and organelle-specific fluorochromes, then analyzed by confocal fluorescence microscopy in baseline conditions or upon exposure to OXA. Only a minority of quinacrine-stained vesicles co-localized with mitochondrion- or ER-specific markers, both in untreated and in chemotherapy-treated U2OS cells. Conversely, in control conditions, most quinacrine-labeled vesicles were co-stained by a lysosome-specific acidophilic dye (LysoTracker Red). After the administration of OXA, the co-localization between quinacrine and either LysoTracker Red or DQ Red BSA (a marker of degradative cell compartments) was significantly reduced (Figures 5a and b and Supplementary Figure 9). Moreover, the destruction of lysosomes by means of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide, a lysosome-disrupting



**Figure 5** Co-localization between ATP-containing vesicles and lysosomes. (a–d) Human osteosarcoma U2OS cells were maintained in control conditions (Co), incubated with 600  $\mu$ M oxaliplatin (OXA) for 18 h (a and b) or with 300  $\mu$ M glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN) for 15 min (c and d), and then co-stained for the fluorescence microscopy-assisted visualization of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence), ATP-containing vesicles (with quinacrine, green fluorescence) and mitochondria (with MitoTracker Red), lysosomes (with LysoTracker Red) or the endoplasmic reticulum (with ERTracker Red). Representative images (scale bar = 10  $\mu$ m), representative fluorescent signals along randomly assigned  $\alpha \rightarrow \omega$  axes and quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Student's  $t$ -test) as compared with cells maintained in Co conditions

cathepsin C substrate,<sup>47</sup> drastically reduced the intensity of quinacrine fluorescence, while leaving the ER and mitochondria morphologically intact (Figures 5c and d). Further supporting the preference of quinacrine for lysosomes, untreated U2OS cells exhibited a preponderant co-localization between quinacrine and an LAMP1–red fluorescent protein (RFP) fusion protein,<sup>48</sup> which is specifically found in lysosomes, and such co-localization was reduced upon exposure to MTX and OXA but not to rapamycin (Figures 6a and b). Concomitantly, OXA, MTX and rapamycin all promoted the co-localization of quinacrine with a RFP-LC3 chimera<sup>49</sup> that marks autophagosomes and autolysosomes (Figures 6c and d). Of note, the fraction of ATP-repleted (that is quinacrine<sup>+</sup>) LAMP1-RFP<sup>+</sup> vesicles decreased upon the administration of OXA (Figures 6e and f). This phenomenon was exacerbated by the siRNA-mediated depletion of ATG5, indicating that lysosomes require autophagy for preserving luminal ATP levels.

Taken together, these findings suggest that lysosomes and autophago(lyso)somes directly participate in the trafficking and/or maintenance of the intracellular ATP pool. Further substantiating this possibility, we found that the depletion of LAMP1, a lysosomal protein that is dispensable for autophagy,<sup>50</sup> abolishes ATP secretion by U2OS cells exposed to MTX or OXA (Figures 7a–c). The knockdown of vesicle-associated membrane protein 1 (VAMP1, also known as synaptobrevin 1), which is known to have a non-redundant role in exocytosis,<sup>51</sup> also inhibited ATP release in this system, similar to the depletion of ATG5 and BCN1 (Figure 7b). Importantly, MTX or OXA induced the translocation of LAMP1 to the cell surface, as determined by immunofluorescence microscopy upon the staining of non-permeabilized cells with a specific antibody. The translocation of LAMP1 to the surface of MTX- or OXA-treated, yet viable (DAPI<sup>+</sup>), U2OS cells, which could be detected either as a standalone



**Figure 6** Chemotherapy-induced ATP redistribution into autophago(lyso)somes. (a–d) Human osteosarcoma U2OS cells stably transfected with a plasmid coding for a LAMP1-RFP (a and b) or a RFP-LC3 (c and d) chimera were maintained in control conditions (Co) or treated with 600  $\mu$ M oxaliplatin (OXA), 4  $\mu$ M mitoxantrone (MTX) or 1  $\mu$ M rapamycin (RAPA) for 18 h, and then processed for the fluorescence microscopy-assisted visualization of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence), ATP-containing vesicles (with quinacrine, green fluorescence) and LAMP1-RFP (a and b) or RFP-LC3 (c and d; both emitting in red). Representative images (scale bar = 10  $\mu$ m), representative fluorescent signals along randomly assigned  $\alpha \rightarrow \omega$  axes and quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (Student's *t*-test) as compared with cells maintained in Co conditions. (e and f) U2OS cells stably expressing LAMP1-RFP were transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with a siRNA targeting ATG5 for 48 h, and then were either maintained in Co conditions or treated with 300 or 600  $\mu$ M OXA for additional 18 h. Finally, cells were processed for the fluorescence microscopy-assisted visualization of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence), ATP-containing vesicles (with quinacrine, green fluorescence) and LAMP1-RFP (emitting in red). Representative images (scale bar = 10  $\mu$ m) and quantitative data on the % of the LAMP1-RFP<sup>+</sup> intracellular surface not stained with quinacrine (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported. \* $P < 0.05$  (Student's *t*-test) as compared with siUNR-transfected cells maintained in Co conditions; # $P < 0.05$  (Student's *t*-test) as compared with siUNR-transfected cells treated with the same dose of OXA

phenomenon or combined with the exposure of PS, was inhibited by Z-VAD-fmk but neither by ROCK1 inhibitors such as Y-27632 and H1152 nor by blebbistatin (Figures 7d and e and Supplementary Figure 10). Accordingly, the knockdown of PANX1 (but not that of ROCK1, ATG5, ATG7 or BCN1) significantly reduced the LAMP1 exposure on the surface of U2OS cells responding to OXA (Figure 7f). Similarly, the depletion of LAMP1 inhibited the OXA-induced translocation of PANX1 to the outer leaflet of the plasma membrane (Figure 7g), pointing to an unexpected link between PANX1 activation and lysosomal traffic.

Altogether, these results indicate that a pool of intracellular ATP distributes between lysosomes and autolysosomes and

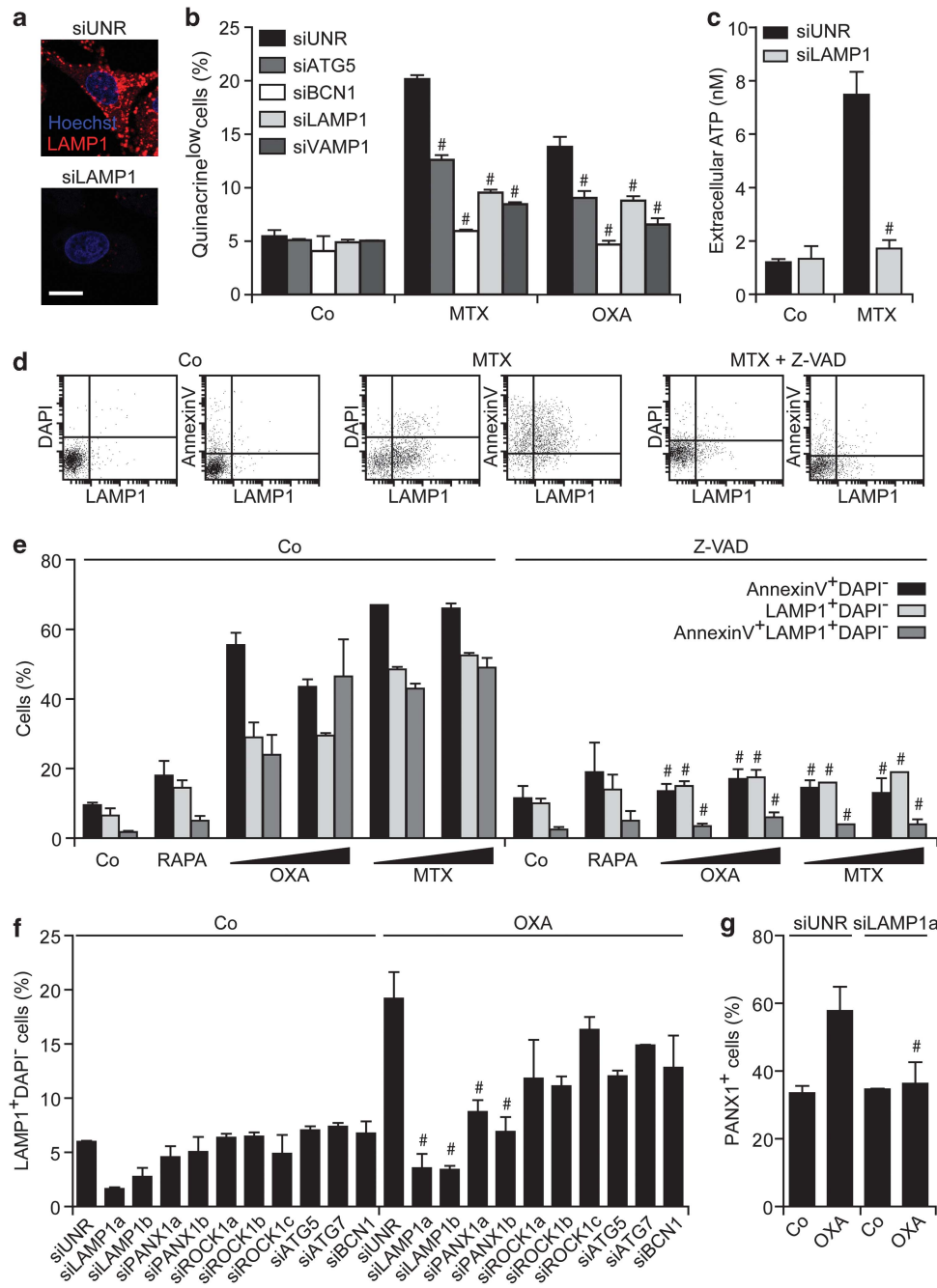
suggest that the lysosomal protein LAMP1 has an essential role in ICD-associated ATP secretion, correlating with its caspase- and PANX1-dependent translocation to the cell surface.

## Discussion

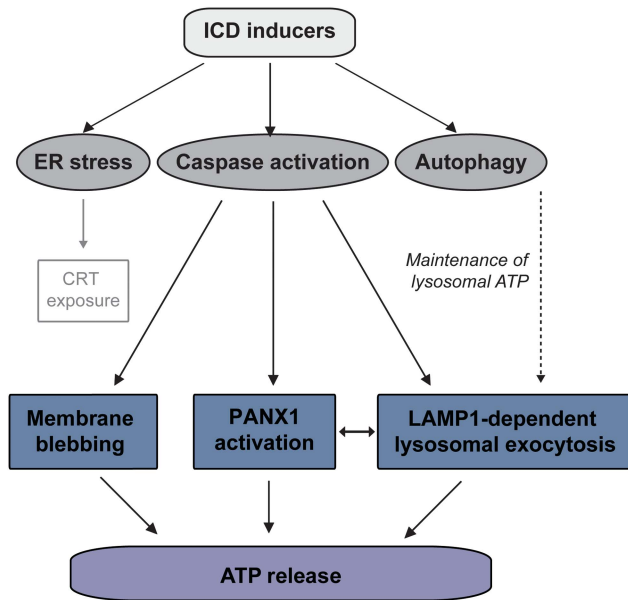
The findings presented in this paper reveal an unexpected complexity in the mechanisms that underpin the secretion of ATP by cancer cells undergoing ICD.

Our results are compatible with the widely accepted model suggesting that the cleavage of PANX1 by caspases is required for its activation.<sup>32–34</sup> Surprisingly, however, the





**Figure 7** Lysosomes and autophago(lyso)somes participate in the trafficking and/or in the maintenance of the intracellular ATP pool. (a–c) Human osteosarcoma U2OS cells were transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with the indicated siRNAs for 48 h, and then maintained in control conditions (Co) or treated with 4  $\mu$ M mitoxantrone (MTX) or 300  $\mu$ M oxaliplatin (OXA) for additional 18 h. Finally, cells were processed for the fluorescence microscopy-assisted visualization of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence), ATP-containing vesicles (with quinacrine, green fluorescence) or LAMP1 (revealed with an secondary antibody emitting in red) (a and b), and ATP levels in culture supernatants assessed by a luciferase-based test (c). Representative images (scale bar = 10  $\mu$ m) and quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported.  $^{\#}P < 0.05$  (Student's *t*-test), as compared with siUNR-transfected cells treated with MTX or OXA, as appropriate. (d and e) U2OS cells were maintained in Co conditions or treated with 1  $\mu$ M rapamycin (RAPA), 150 or 300  $\mu$ M OXA, or 2 or 4  $\mu$ M MTX, alone or in combination with 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk (Z-VAD), for 18 h. Thereafter, LAMP1 exposure (with a LAMP1-specific antibody revealed in red), phosphatidylserine externalization (with FITC-conjugated AnnexinV, green fluorescence) and cell death-associated plasma membrane permeabilization (with DAPI, blue fluorescence) were monitored by flow cytometry. Quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported.  $^{\#}P < 0.05$  (Student's *t*-test), as compared with cells treated with an equivalent concentration of OXA or MTX in the absence of Z-VAD. (f and g) U2OS cells were transfected with siUNR or with the indicated siRNAs for 48 h, and then either left untreated (Co) or exposed to 300  $\mu$ M OXA for 18 h. Finally, either LAMP1 exposure (with a LAMP1-specific antibody revealed in red), and cell death-associated plasma membrane permeabilization (with DAPI, blue fluorescence) was assessed by cytofluorimetry (f), or PAX1 exposure was determined by immunofluorescence microscopy (g). Quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ) are reported.  $^{\#}P < 0.05$  (Student's *t*-test), as compared with siUNR-transfected cells treated with OXA



**Figure 8** Mechanism of ATP secretion during immunogenic cell death (ICD). ICD inducers such as mitoxantrone and oxaliplatin simultaneously activate various cytoprotective and cytotoxic signaling pathways, including the endoplasmic reticulum (ER) stress response, which is responsible for the exposure of calreticulin (CRT) on the cell surface; the caspase cascade, which – among various pro-apoptotic functions – mediates cell blebbing as well as the activation of pannexin 1 (PANX1); and autophagy, which is required for the trafficking/maintenance of vesicular ATP pools. A complex crosstalk among all these signaling modules appears to be required for the ICD-associated release of ATP

broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk not only did reduce the channel activity of PANX1, but also affected its subcellular localization. The amount of immunofluorescence-detectable PANX1 increased at the surface of cells exposed to ICD inducers, and this effect was strictly caspase dependent. Nonetheless, the knockdown of either ATG5 or ATG7, an autophagy-inhibitory manipulation that strongly inhibits ICD-associated ATP secretion, failed to influence the surface exposure and activation state of PANX1. This held true in two distinct models, that is, the caspase-dependent activation of PANX1 as triggered by ICD inducers and the inducible expression of an artificially truncated variant of PANX1 (tPANX1), *de facto* mimicking the effect of caspase activation. In both these models, the inhibition of autophagy failed to prevent the selective increase in the permeability of the plasma membrane to the small fluorophore YO-PRO-1.

It is generally assumed that ATP freely distributes in the cytosol at a concentration of 1–10 mM<sup>52</sup> and that the opening of channels across the plasma membrane would allow for its passive diffusion into the extracellular space.<sup>53</sup> Our observations are at odds with this view. Indeed, the caspase-induced formation as well as the transfection-enforced expression of tPANX1 increased the permeability of the plasma membrane to YO-PRO-1 in both wild-type and autophagy-deficient cells, yet ATP was efficiently released only by the former. As the total amount of intracellular ATP is not reduced in autophagy-deficient cells, neither in baseline conditions nor upon exposure to chemotherapy,<sup>23</sup> these results imply that the sole presence of open PANX1 channels is not sufficient for ATP release.

In line with this notion, we found that a substantial fraction of intracellular ATP is present in cytoplasmic vesicles rather than in the cytosol, explaining why it cannot diffuse freely across open PANX1 channels. ATP-containing vesicles turned out to stain positively for lysosomal markers including LAMP1, especially in baseline conditions, an observation that has previously been reported for several cell types.<sup>35,54</sup> In response to chemotherapy, approximately half of ATP-containing cytoplasmic vesicles maintained their co-localization with LAMP1, yet most of them became positive for RFP-LC3, indicating that in these conditions ATP redistributes to autophagosomes and autolysosomes.

The depletion of LAMP1 as well as that of the lysosomal SNAP receptor (SNARE) VAMP1 and other SNAREs involved in exocytosis (such as VAMP7)<sup>30</sup> inhibited ICD-associated ATP release *in vitro*, supporting the notion that lysosomal exocytosis would provide a major contribution to this process. Indeed, a substantial fraction of cells responding to chemotherapy *in vitro* exposed LAMP1 on the cell surface as it externalized PS residues, in line with the hypothesis that lysosomes fuse with the plasma membrane during the apoptotic process.<sup>55</sup> In this setting, the depletion of essential autophagic factors including ATG5, ATG7 and BCN1 failed to affect the translocation of LAMP1 to the outer leaflet of the plasma membrane, meaning that autophagy is not required for lysosomal exocytosis. In sharp contrast, the knockdown of PANX1 prevented LAMP1 from translocating to the plasma membrane, and *vice versa* LAMP1 depletion interfered with the externalization of PANX1. Moreover, both PANX1 and LAMP1 were unable to translocate to the plasma membrane in the presence of the broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk. Altogether, these results suggest that lysosomal exocytosis is essential for the ICD-associated secretion of ATP and that PANX1 contributes to this process through yet-to-be determined mechanisms.

Interestingly, the inhibition or depletion of ROCK1 and myosin II reduced the release of ATP from cells exposed to ICD inducers. Thus, the apoptotic blebbing of the plasma membrane appears to be required for ICD-associated ATP secretion, yet could not be connected to any other mechanistic module involved in this process. Indeed, blebbing inhibitors failed to interfere with PANX1 translocation/activation, autophagy and lysosomal exocytosis. *Vice versa*, the inhibition of PANX1, autophagy and lysosomal exocytosis did not affect blebbing. Hence, blebbing may constitute the very last step in the cascade of events that mediate the ICD-related secretion of ATP, operating downstream of PANX1 channel opening, autophagy and LAMP1 translocation. Formal evidence in support of this hypothesis is still missing.

An important question that remains to be addressed in further detail concerns the contribution of autophagy to ATP release. The suppression of autophagy indeed did not affect PANX1 channel function and the relocalization of LAMP1 to the cell surface. Nonetheless, ATP redistributes to *bona fide* autophago(lyso)somes in response to ICD inducers, at least *in vitro*. As a possibility, such an autophagy-dependent redistribution of ATP may favor the transport of ATP-containing vesicles to the cell periphery, yet is not required for the exocytosis of LAMP1<sup>+</sup> vesicles that do not contain ATP.

Altogether, our findings reveal a surprisingly complex pathway that mediates the ICD-associated secretion of ATP (Figure 8), involving molecules that are essential for apparently distinct processes such as autophagy (i.e., ATG5, ATG7 and BCN1), lysosomal exocytosis (i.e., LAMP1, VAMP1), apoptosis (i.e., caspases), membrane blebbing (i.e., ROCK1, myosin II) and plasma membrane permeabilization (i.e., PANX1). Molecular defects in any of these systems are sufficient to abolish the in of ATP from cells exposed to ICD inducers, meaning that alterations in autophagy, lysosomal function, caspase activation, membrane blebbing and plasma membrane permeabilization might all contribute to the development of therapy-resistant neoplasms.

## Materials and Methods

**Chemical, cell lines and culture conditions.** Unless otherwise indicated, media, antibiotics and supplements for cell culture were purchased from Gibco-Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), plasticware from Corning B.V. Life Sciences (Schiphol-Rijk, the Netherlands) and chemicals from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). H-1152 was purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA), benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone (Z-VAD-fmk) from Bachem (Bubendorf, Switzerland), G418 sulfate from Calbiochem (San Diego, CA, USA), and puromycin and zeocin from Invivogen (San Diego, CA, USA). Murine colon carcinoma CT26 cells (MHC Class I haplotype H-2<sup>d</sup>, syngenic to BALB/c mice), murine fibrosarcoma MCA205 cells (MHC Class I haplotype H-2<sup>b</sup>, syngenic to C57Bl/6 mice) and their derivatives were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES buffers, 10 U/ml penicillin sodium and 10 µg/ml streptomycin sulfate, whereas human osteocarcinoma U2OS cells and their derivatives were maintained in DMEM supplemented as above. U2OS cells stably co-expressing GFP-LC3 or HMGB1-GFP<sup>56</sup> were maintained under 200 µg/ml G418 selective pressure. U2OS cells engineered for the stable expression of a CRT-GFP fusion<sup>17</sup> were cultured in the continuous presence of 100 µg/ml zeocin. Control (SCR), Atg5<sup>KD</sup> and Atg7<sup>KD</sup> MCA205 cells<sup>23</sup> were maintained under 5 µg/ml puromycin selection. To obtain cells stably expressing GFP-LC3, RFP-LC3, H2B-RFP or LAMP1-RFP chimeras, the corresponding constructs (Addgene, Cambridge, MA, USA) were transfected into U2OS cells using the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. Transfected cells were then maintained under 500 µg/ml G418 selection, and GFP- or RFP-expressing cells were cloned by cytofluorometry and amplified.

**RNA interference and transfections.** siRNAs specific for murine Atg5 (sense 5'-CAUCAACCGGAACUCAUdTdT-3'), murine Atg7 (sense 5'-AGUUUCAGUCCGUUGAAdTdT-3'), human ATG5 (sense 5'-CCUUUGGCCUAGAAGAAdTdT-3'), human ATG7 (sense 5'-CGACUUGUCCUACGGAAdTdT-3') human BCN1 (sense 5'-CAGUGGAUCUAAACUCAAdTdT-3'), human LAMP1 (siLAMP1a sense 5'-CGAGAAUAGCAACAGUAdTdT-3'; siLAMP1b sense, 5'-GGAAUCCAGUUGAAUACAAdTdT-3'), human ROCK1 (siROCK1a sense 5'-GCCGCCGGGACCAACUAUdTdT-3'; siROCK1b sense 5'-CAGCCAUACAUCAAGAAdTdT-3'; siROCK1c sense 5'-GACUAUACAAACUAAUUUdTdT-3') and human VAMP1 (sense 5'-GGACAUAUGCGUGUGAAUdTdT-3'), as well as a siRNA unrelated to the murine and human genome (siUNR, sense 5'-GCCGGUAGCCGGUUAAGUdTdT-3')<sup>57</sup> were purchased from Sigma-Proligo (Woodlands, TX, USA). In addition, pre-designed commercial siRNAs specific for murine Bcn1 (sc-29798) and human SL17A9 (best known as VNUT; sc-72740) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Cells (at 30–40% confluence) were transfected with siRNAs by means of the HiPerFect transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany) as instructed per manufacturer's instructions, and were used in experimental determinations no earlier than 48 h after transfection, when target downregulation was monitored by immunoblotting (see below). Transient plasmid transfections were carried out by means of the Lipofectamine 2000 transfection reagent.

**Inducible expression of tPANX1.** The sequence coding for PANX1 residues 1–371 coupled to a Flag tag (DYKDDDDK) was amplified from a

pEBB-Flag vector encoding the PANX1 site B mutant (kindly provided by Dr. Kodi S Ravichandran, Carter Immunology Center, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA) by means of the following primers: 5'-ATGCTAGCATGGCCATCGCTCAACTG-3' and 5'-CAATTTTGAAGTGGTACCTCACTTGTCATCG-3'. The PCR product was digested with *Bst*BI and *Nhe*I-HF (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and inserted into the pCDH-CuO-MCS-EF1-CymR-T2A-Puro All-in-one inducible lentiviral vector (System Biosciences, Mountain View, CA, USA), fused to a hemagglutinin tag. Pseudotyped lentiviral particles coding for tPANX1 were produced with the ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Life Technologies), following standard protocols. MCA205 cells were infected with lentiviral vectors at a multiplicity of infection of five in complete culture medium supplemented with 5 µg/ml polybrene overnight. The lentivirus-containing medium was removed and infected cells were allowed to recover in fresh medium for 24 h before the addition of 5 µg/ml puromycin as a selection antibiotic. One week later, single-cell clones were isolated on a FACSVantage cytofluorometer (Becton Dickinson, San José, CA, USA), amplified and screened for constitutive Flag or hemagglutinin (tPANX1) expression.

**Immunoblotting.** For immunoblotting, approximately  $1 \times 10^6$  cells were washed with cold PBS and lysed following standard procedures.<sup>58</sup> To this aim, 50 µg of proteins were separated according to molecular weight on NuPAGE Novex Bis-Tris 4–12% pre-cast gels (Life Technologies) and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Unspecific binding sites were blocked by incubating membranes for 1 h in 0.05% Tween-20 (v/v in TBS) supplemented with 5% non-fat powdered milk or bovine serum albumin, followed by overnight incubation at 4 °C with primary antibodies specific for: ATG5 (Sigma-Aldrich), ATG7 (Sigma-Aldrich), BCN1 (Santa-Cruz Biotechnology), GAPDH (Millipore, Billerica, MA, USA), LC3B (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), p62 (Abnova, Taipei, Taiwan), ROCK1 (Biosciences, San Diego, CA, USA) or VNUT (Santa-Cruz Biotechnology). Equal lane loading was monitored by probing membranes with antibodies specific for  $\beta$ -actin (Millipore-Chemicon International, Temecula, CA, USA) or GAPDH (Millipore-Chemicon International). Primary antibodies were detected with appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (Southern Biotechnologies Associates, Birmingham, UK) and were revealed on a ImageQuant LAS 4000 software-assisted imager (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) upon incubation with the SuperSignal West Pico reagent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) or the ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare).

**Cell death and membrane permeability assays.** Apoptotic cell death was monitored by virtue of PS exposure and the uptake of the vital dye DAPI.<sup>59,60</sup> To this aim, cells were washed twice with PBS and resuspended in  $1 \times$  binding buffer supplemented with PE- or fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated AnnexinV (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and DAPI, as per manufacturer's instructions. For the assessment of plasma membrane permeability, cells were incubated in culture medium supplemented with 1 µM YO-PRO-1 (Molecular Probes-Life Technologies, Eugene, CA, USA) for 30 min at 37 °C. Cytofluorometric determinations were carried out on a Gallios cytofluorometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and data were analyzed by means of the Kaluza software v. 1.1 (Beckman Coulter) upon gating on events displaying normal forward scatter and side scatter parameters.

**Labeling of vesicular ATP.** Vesicular ATP was detected by fluorescence microscopy or cytofluorometry, as previously described.<sup>29</sup> For fluorescence microscopy studies, cells were loaded with 5 µM quinacrine in Krebs-Ringer solution (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM glucose and 25 mM HEPES buffer, pH 7.4) for 30 min at 37 °C. Thereafter, cells were co-stained for 10 min with 1 µg/ml propidium iodide (PI) and 10 µM Hoechst 33342 (both from Molecular Probes-Life Technologies), rinsed with Krebs-Ringer solution and examined on a confocal SPE microscope equipped with Apochromat 63 × 1.3 NA and 40 × 1.15 NA oil immersion objectives (Leica, Wetzlar, Germany). The open-source software Image J (freely available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) was used to determine co-localization profiles for quantitative studies. The percentage of co-localization between LAMP1-RFP or RFP-LC3 and quinacrine was calculated by means of the Metamorph software v. 6.2r4 (Universal Imaging Corp., Detroit, MI, USA). For cytofluorometric determinations, cells were loaded with 1 µM quinacrine as described above, rinsed and resuspended in 1 µg/ml PI or, alternatively, loaded with 30 µM Bodipy-ATP (Life Technologies), following the manufacturer's recommendations.



In both cases, fluorescence was acquired on a FACSVantage cytofluorometer and first-line statistical analyses were performed by means of the CellQuest software (Becton Dickinson) upon gating on events displaying normal forward scatter and side scatter parameters.

**Cells sorting.** One million five hundred thousand U2OS cells were stained with 150 nM tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM, from Molecular Probes-Life Technologies) for 30 min at 37 °C, washed twice with cold PBS and resuspended in 1 × binding buffer supplemented with FITC-conjugated Annexin V (BD Biosciences) and 10 μM DAPI, as per manufacturer's instructions. Cells were sorted in three sub-populations (DAPI<sup>−</sup>PS<sup>−</sup>TMRM<sup>low</sup>; DAPI<sup>−</sup>PS<sup>−</sup>TMRM<sup>high</sup>; DAPI<sup>−</sup>PS<sup>+</sup>TMRM<sup>low</sup>) on a FACSVantage cytofluorometer and then either collected for the assessment of intracellular ATP or maintained in culture for additional 60 min for the quantification of extracellular ATP (see below).

**ATP release assays.** Extracellular and intracellular ATP levels were measured by the luciferin-based ENLITEN ATP Assay (Promega, Madison, WI, USA) and ATP assay (Calbiochem) kits, respectively. ATP-driven chemoluminescence was recorded on a FLUOstar OPTIMA FL Plate Reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

**Cell trackers.** Cells were grown in Lab-Tek chambered coverglasses (NUNC, Roskilde, Denmark). Upon the removal of the culture medium, cells were incubated with pre-warmed medium containing 500 nM MitoTracker, 500 nM ER-Tracker, 500 nM LysoTracker or 10 μg/ml DQ Red BSA (all from Molecular Probes-Life Technologies) for 1 h at 37 °C. Thereafter, cells were rinsed twice with pre-warmed medium, labeled with quinacrine and Hoechst 33342 and processed for fluorescence microscopy, as described above.

**Analysis of cell-surface-exposed LAMP1.** Cells were washed twice with cold PBS, incubated for 45 min with a PE-conjugated LAMP1-specific antibody (Biolegend, San Diego, CA, USA) or isotype-matched control antibodies (Biolegend) in cold blocking buffer (3% fetal bovine serum in PBS). Upon washing in cold PBS, samples were stained with DAPI and analyzed for the presence of LAMP1 at the surface of viable (DAPI<sup>−</sup>) cells on a Gallios cytofluorometer. First-line statistical analyses were performed by means of the Kaluza software v. 1.1.

**Study of cell-surface-exposed PANX1.** PANX1 exposure was assessed by surface immunostaining coupled to fluorescence microscopy. To this aim, cells grown on Lab-Tek chambered coverglasses were washed in PBS, incubated with blocking buffer containing an anti-PANX1 antibody (Abcam, Cambridge, UK) for 30 min on ice, washed again and incubated for 30 min with an anti-rabbit Alexa Fluor 488 conjugate (Life Technologies). Finally, samples were fixed with 3.7% paraformaldehyde and 1 μg/ml Hoechst 33342 (w/v in PBS) and analyzed on a confocal SPE microscope equipped with Apochromat × 63 1.3 NA and × 40 1.15 NA oil immersion objectives.

**Automated high-content videomicroscopy.** Eighty thousand CRT-GFP-, HMGB1-GFP-, GFP-LC3-expressing or wild-type U2OS cells seeded in poly-L-lysine-coated 96-well Black/Clear Imaging Plates (BD Biosciences) were pre-treated with compounds from the ICCB Known Bioactives Library (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) or the US-Drug collection (Microsource Discovery Systems, Gaylordville, CT, USA) at a final concentration of 30 and 2 μM, respectively, for 2 h, followed by the administration of 4 μM MTX or an equivalent volume of PBS. Twenty-four hours later, four to nine viewfields per well were acquired by means of a BD Pathway 855 imaging station (BD Biosciences) and images were analyzed for GFP-LC3 dots, CRT-GFP granularity, ATP secretion or HMGB1-GFP release by using the AttoVision software v. 1.6 (BD Biosciences).

**Animal experiments.** Animals were maintained in appropriate pathogen-free conditions and all experiments were conducted in lines with the Federation of European Laboratory Animal Science Association guidelines, were approved by the local Ethics Committee (CEEA IRCIV/ IGR n°26, registered with the French Ministry of Research) and were in compliance with the EU 63/2010 directive. BALB/c (MHC Class I haplotype H-2<sup>d</sup>) and C57Bl/6 (MHC Class I haplotype H-2<sup>b</sup>) mice were obtained from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) or Harlan (Gannat, France), used between 6 and 20 weeks of age and euthanatized when tumors exceeded 20–25% of the total body mass.

**Anti-tumor vaccination experiments.** CT26 cells were treated by 2 μM MTX, either alone or upon exposure to 10 μM DIDS, 10 μM SITS, 30 μM Y-27632, 2 μM H-1115 or 50 μM blebbistatin, and inoculated 24 h later ( $3 \times 10^6$  in 200 μl PBS, pH 7.4) s.c. in the lower flank of 6-week-old female BALB/c mice. Seven days later,  $5 \times 10^5$  living CT26 cells (in 200 μl PBS, pH 7.4) were inoculated into the contralateral flank, as previously described.<sup>7,8</sup> Similarly, MCA205 cells were incubated with 1 μM MTX (alone or upon exposure to additional chemicals, as detailed above) for 24 h and then subcutaneously inoculated ( $3 \times 10^5$  in 200 μl PBS, pH 7.4) into the lower flank of 6-week-old C57Bl/6 female mice. Seven days later,  $3 \times 10^4$  untreated MCA205 cells (in 200 μl PBS, pH 7.4) were inoculated into the contralateral flank. In both cases, mice were monitored for the appearance of tumors three times a week for 60 days.

**Statistical analyses.** Each experiment has been repeated at least three times, yielding comparable results. Unless otherwise indicated, figures illustrate quantitative data from one representative experiment (means ± S.E.M.,  $n = 3$  replicate samples). Data were analyzed by means of Prism v. 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and Excel 2007 (Microsoft, Rockville, MD, USA). Statistical significance was assessed by two-tailed Student's *t*-tests or log-rank tests, as appropriate. In all experiments, *P*-values < 0.05 were considered as statistically significant.

## Conflict of Interest

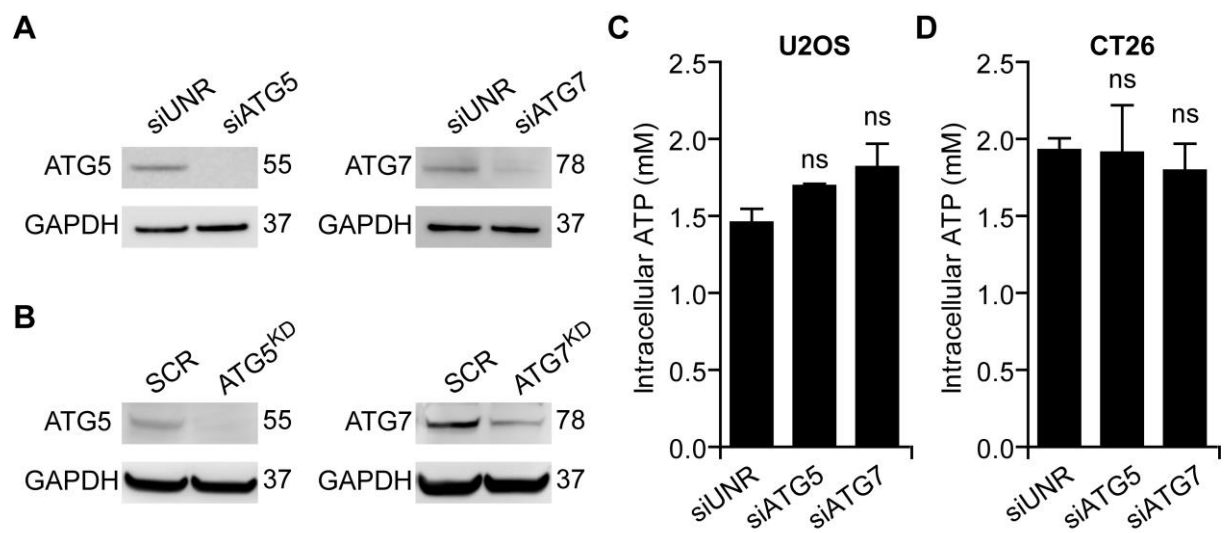
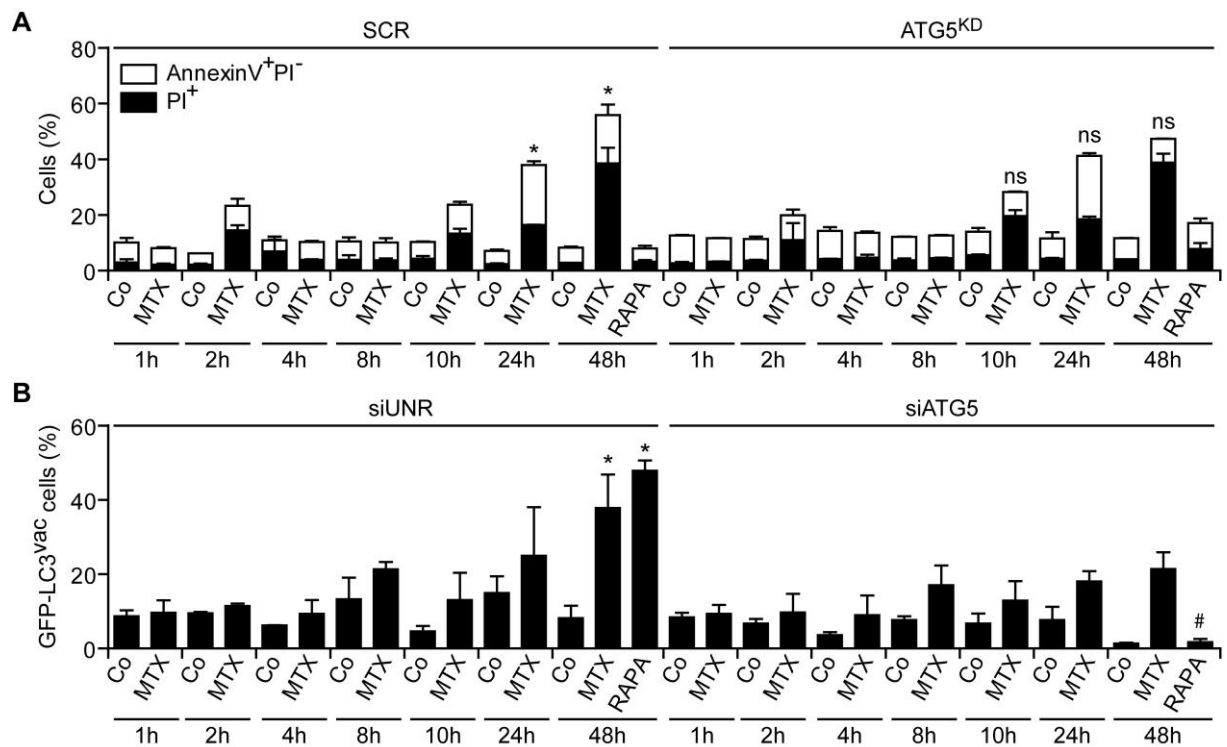
The authors declare no conflict of interest.

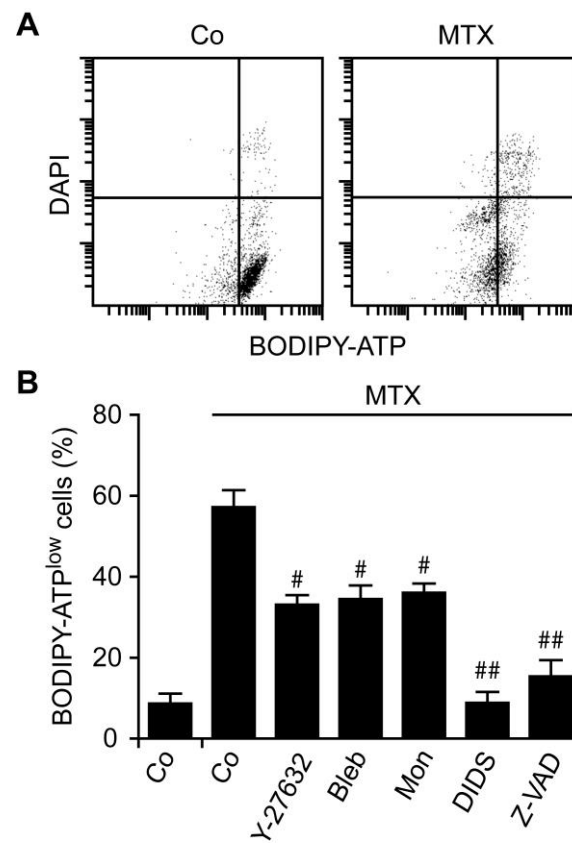
**Acknowledgements.** IM is supported by Ligue National contre le Cancer, while JLP is funded by Sidaction and Natixis. GK is supported by the European Commission (ArtForce); Agence National de la Recherche (ANR); Ligue National contre le Cancer (Equipe labellisée); Fondation pour la Recherche Médicale (FRM); Institut National du Cancer (INCa); LabEx Immuno-Oncologie; Fondation de France; Fondation Bettencourt-Schueller; AXA Chair for Longevity Research; Cancéropôle Ile-de-France; Paris Alliance of Cancer Research Institutes (PACRI) and Cancer Research for Personalized Medicine (CARPEM).

- Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2012; **11**: 215–233.
- Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 2013; **31**: 51–72.
- Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 860–875.
- Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 237–251.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV *et al*. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 107–120.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH *et al*. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 3–11.
- Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N *et al*. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005; **202**: 1691–1701.
- Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P *et al*. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 1848–1850.
- Tanaka H, Matsushima H, Nishibu A, Clausen BE, Takashima A. Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation. *Cancer Res* 2009; **69**: 6987–6994.
- Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F *et al*. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007; **56**: 641–648.
- Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 353–363.
- Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 780–788.
- Ferguson TA, Choi J, Green DR. Armed response: how dying cells influence T-cell functions. *Immunol Rev* 2011; **241**: 77–88.
- Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F *et al*. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 2010; **29**: 482–491.

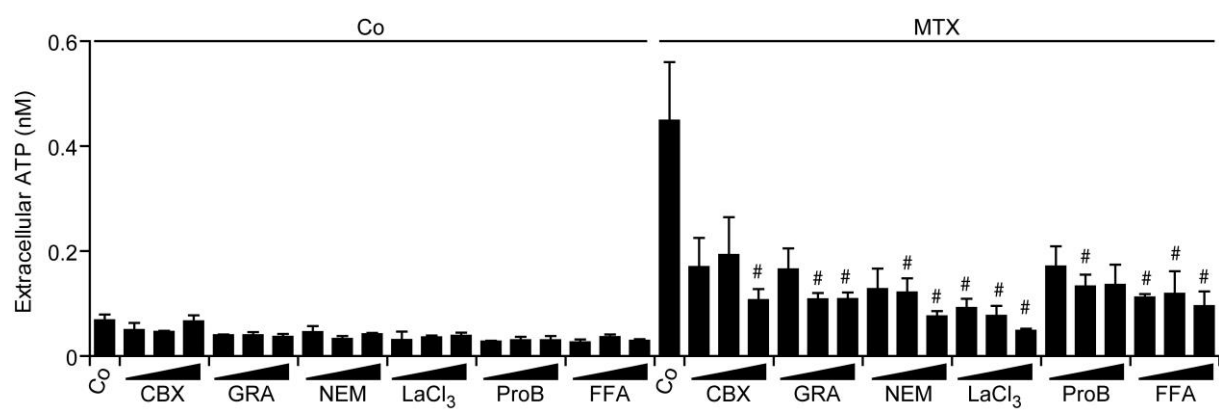
15. Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F *et al*. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res* 2011; **71**: 768–778.
16. Senovilla L, Vitale I, Martins I, Tailler M, Pailleret C, Michaud M *et al*. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science* 2012; **337**: 1678–1684.
17. Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, Martins I, Ma Y, Shen S *et al*. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Sci Transl Med* 2012; **4**: 143ra199.
18. Kepp O, Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, Martins I, Ma Y *et al*. Anticancer activity of cardiac glycosides: at the frontier between cell-autonomous and immunological effects. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 1640–1642.
19. Menger L, Vacchelli E, Kepp O, Eggermont A, Tartour E, Zitvogel L *et al*. Trial watch: cardiac glycosides and cancer therapy. *Oncoimmunology* 2013; **2**: e23082.
20. Vacchelli E, Galluzzi L, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, Tartour E *et al*. Trial Watch: chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 179–188.
21. Vacchelli E, Senovilla L, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Zitvogel L *et al*. Trial Watch: chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* 2013; **2**: e23510.
22. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL *et al*. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; **13**: 54–61.
23. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P *et al*. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011; **334**: 1573–1577.
24. Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, Yamazaki T, Aymeric L, Yang H *et al*. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* 2013; **38**: 729–741.
25. Ayna G, Krysko DV, Kaczmarek A, Petrovski G, Vandenabeele P, Fesus L. ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. *PLoS One* 2012; **7**: e40069.
26. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol* 2012; **13**: 343–351.
27. Vacchelli E, Galluzzi L, Rousseau V, Rigoni A, Tesniere A, Delahaye N *et al*. Loss-of-function alleles of P2RX7 and TLR4 fail to affect the response to chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 271–278.
28. Michaud M, Sukkurwala AQ, Martins I, Shen S, Zitvogel L, Kroemer G. Subversion of the chemotherapy-induced anticancer immune response by the ecto-ATPase CD39. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 393–395.
29. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, Schlemmer F, Senovilla L *et al*. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* 2009; **8**: 3723–3728.
30. Fader CM, Aguilera MO, Colombo MI. ATP is released from autophagic vesicles to the extracellular space in a VAMP7-dependent manner. *Autophagy* 2012; **8**: 1741–1756.
31. Sandilos JK, Chiu YH, Chekeni FB, Armstrong AJ, Walk SF, Ravichandran KS *et al*. Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region. *J Biol Chem* 2012; **287**: 11303–11311.
32. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF *et al*. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009; **461**: 282–286.
33. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER *et al*. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 2010; **467**: 863–867.
34. Qu Y, Misaghi S, Newton K, Gilmour LL, Louie S, Cupp JE *et al*. Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol* 2011; **186**: 6553–6561.
35. Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q *et al*. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 945–953.
36. Pangrsic T, Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A *et al*. Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem* 2007; **282**: 28749–28758.
37. Martins I, Michaud M, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Shen S *et al*. Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death. *Autophagy* 2012; **8**: 413–415.
38. Akopova I, Tatur S, Grygorczyk M, Luchowski R, Gryczynski I, Gryczynski Z *et al*. Imaging exocytosis of ATP-containing vesicles with TIRF microscopy in lung epithelial A549 cells. *Purinergic Signal* 2012; **8**: 59–70.
39. Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR *et al*. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science* 2003; **299**: 1743–1747.
40. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T *et al*. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997; **389**: 990–994.
41. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 339–345.
42. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 346–352.
43. Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC *et al*. P2 × 7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **295**: C752–C760.
44. Sathe MN, Woo K, Kresge C, Bugde A, Luby-Phelps K, Lewis MA *et al*. Regulation of purinergic signaling in biliary epithelial cells by exocytosis of SLC17A9-dependent ATP-enriched vesicles. *J Biol Chem* 2011; **286**: 25363–25376.
45. Mullick A, Xu Y, Warren R, Koutroumanis M, Guilbault C, Broussau S *et al*. The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol* 2006; **6**: 43.
46. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; **8**: 445–544.
47. Berg TO, Stromhaug E, Lovdal T, Seglen O, Berg T. Use of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide, a lysosome-disrupting cathepsin C substrate, to distinguish between lysosomes and prelysosomal endocytic vacuoles. *Biochem J* 1994; **300**(Pt 1): 229–236.
48. Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Ingmundson A, Homer SM, Cicchetti G *et al*. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* 2003; **4**: 785–801.
49. Morselli E, Marino G, Bennetzen MV, Eisenberg T, Megalou E, Schroeder S *et al*. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J Cell Biol* 2011; **192**: 615–629.
50. Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S *et al*. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* 2005; **118**: 3091–3102.
51. Liu Y, Sugiura Y, Lin W. The role of synaptobrevin1/VAMP1 in Ca<sup>2+</sup>-triggered neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 2011; **589**: 1603–1618.
52. Ainscow EK, Mirshamsi S, Tang T, Ashford ML, Rutter GA. Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K(+) channels. *J Physiol* 2002; **544**: 429–445.
53. Li A, Banerjee J, Leung CT, Peterson-Yantorno K, Stamer WD, Civan MM. Mechanisms of ATP release, the enabling step in purinergic dynamics. *Cell Physiol Biochem* 2011; **28**: 1135–1144.
54. Gonzales E, Julien B, Serriere-Lanneau V, Nicou A, Doignon I, Lagoudakis L *et al*. ATP release after partial hepatectomy regulates liver regeneration in the rat. *J Hepatol* 2010; **52**: 54–62.
55. Franz S, Herrmann K, Furnrohr BG, Sherif A, Frey B, Gaip US *et al*. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 733–742.
56. Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S *et al*. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* 2011; **30**: 1147–1158.
57. de La Motte Rouge T, Galluzzi L, Olausson KA, Zermati Y, Tasdemir E, Robert T *et al*. A novel epidermal growth factor receptor inhibitor promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells resistant to erlotinib. *Cancer Res* 2007; **67**: 6253–6262.
58. Galluzzi L, Morselli E, Vitale I, Kepp O, Senovilla L, Criollo A *et al*. miR-181a and miR-630 regulate cisplatin-induced cancer cell death. *Cancer Res* 2010; **70**: 1793–1803.
59. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011; **10**: 221–237.
60. Galluzzi L, Zamzami N, de La Motte Rouge T, Lemaire C, Brenner C, Kroemer G. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis* 2007; **12**: 803–813.

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

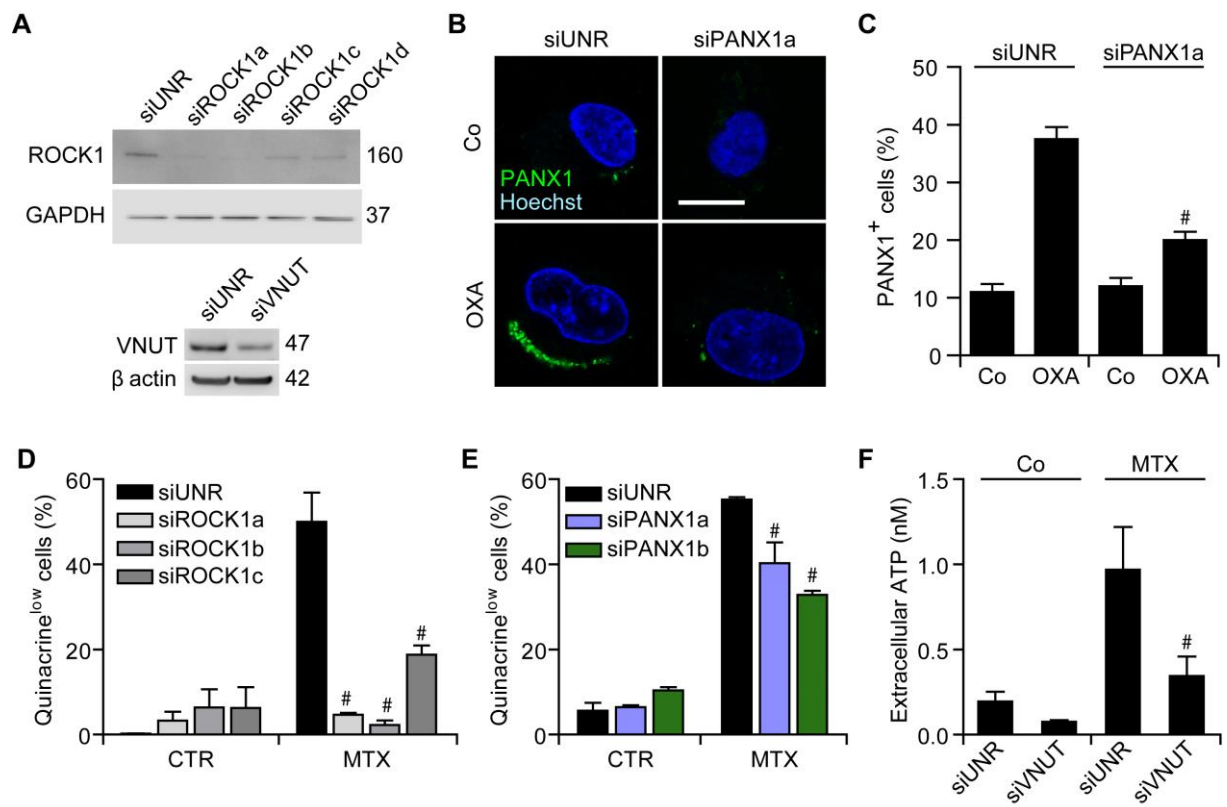




Suppl. Figure 3

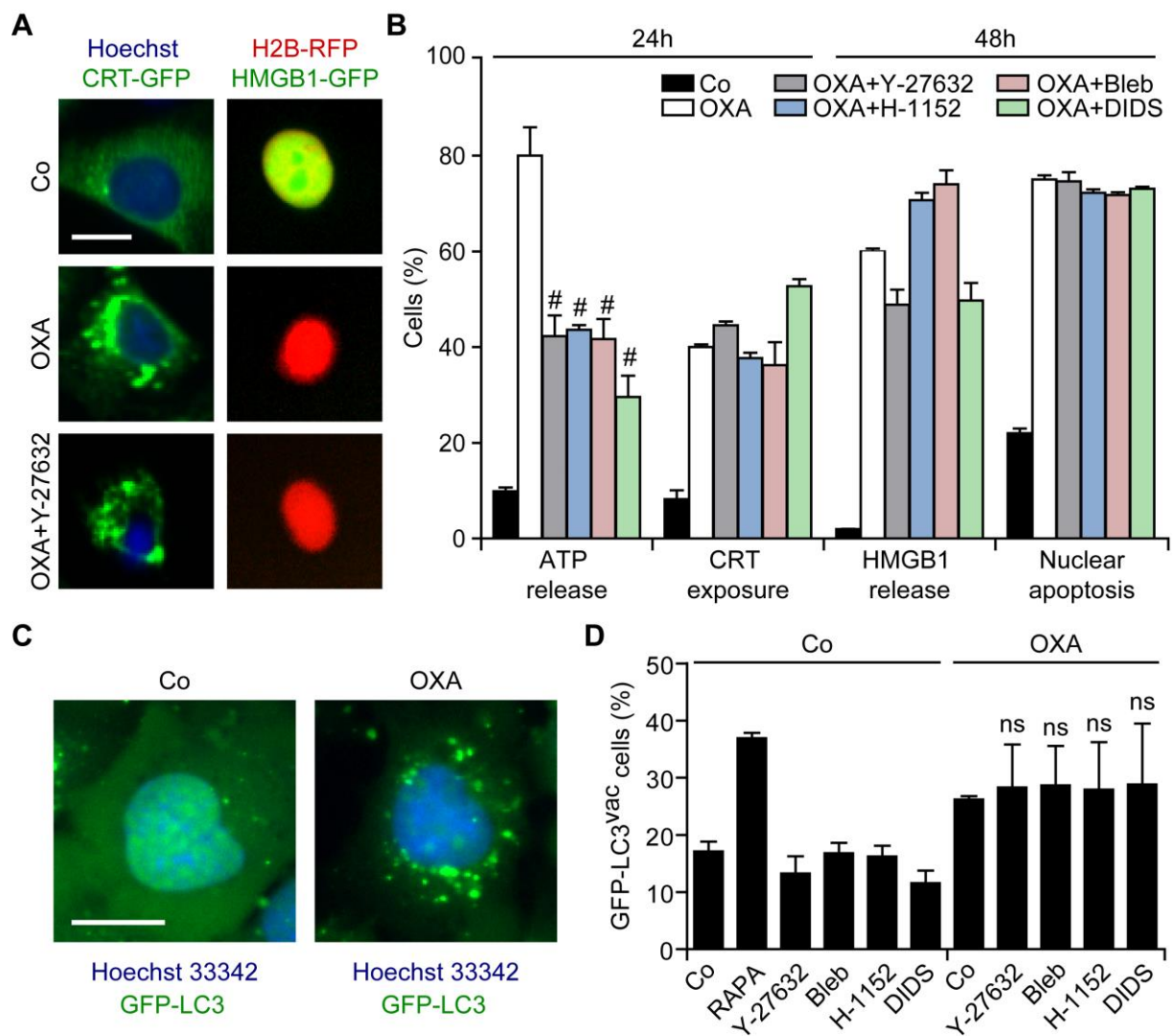


Suppl. Figure 4

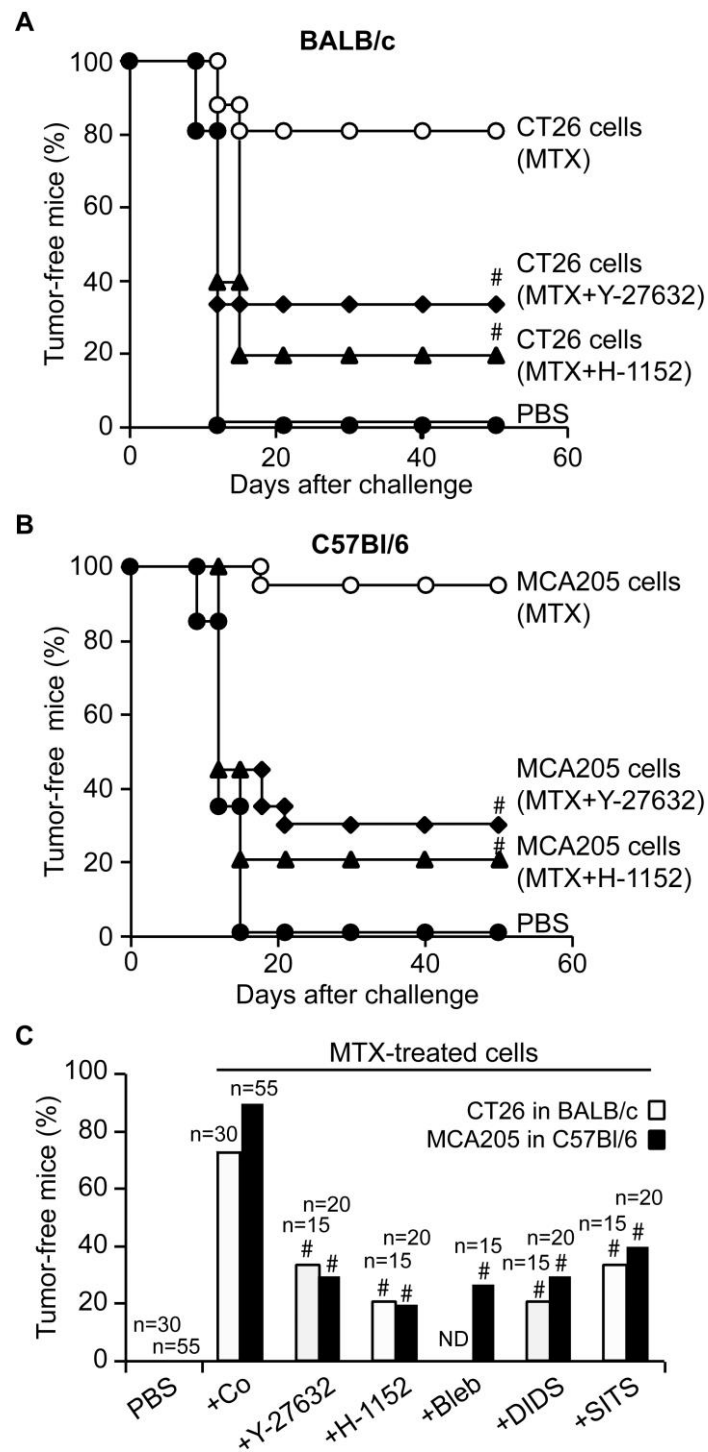


**Suppl. Figure 5**

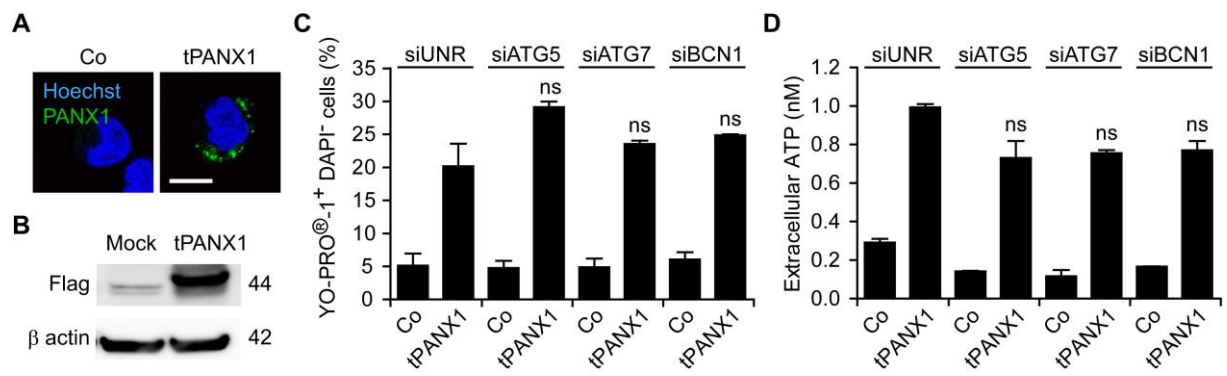




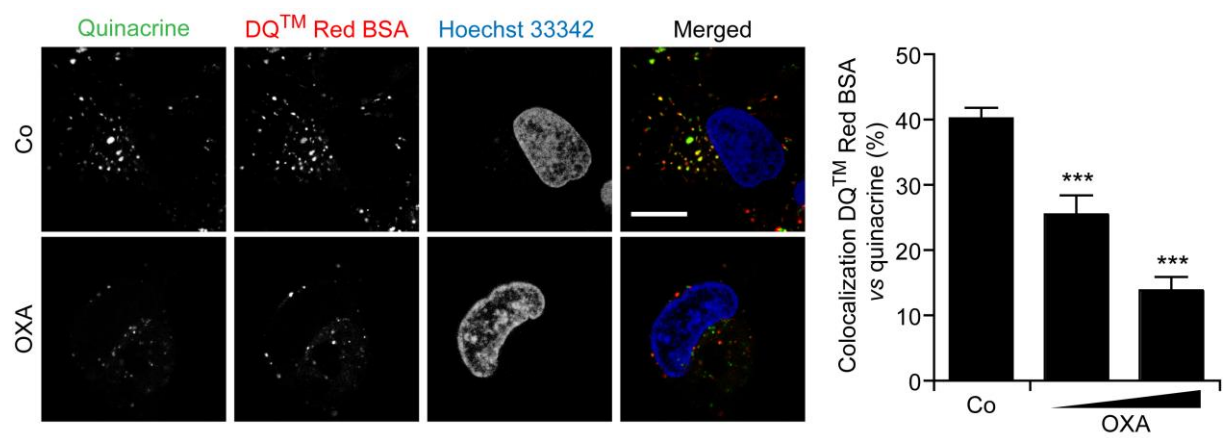
**Suppl. Figure 6**



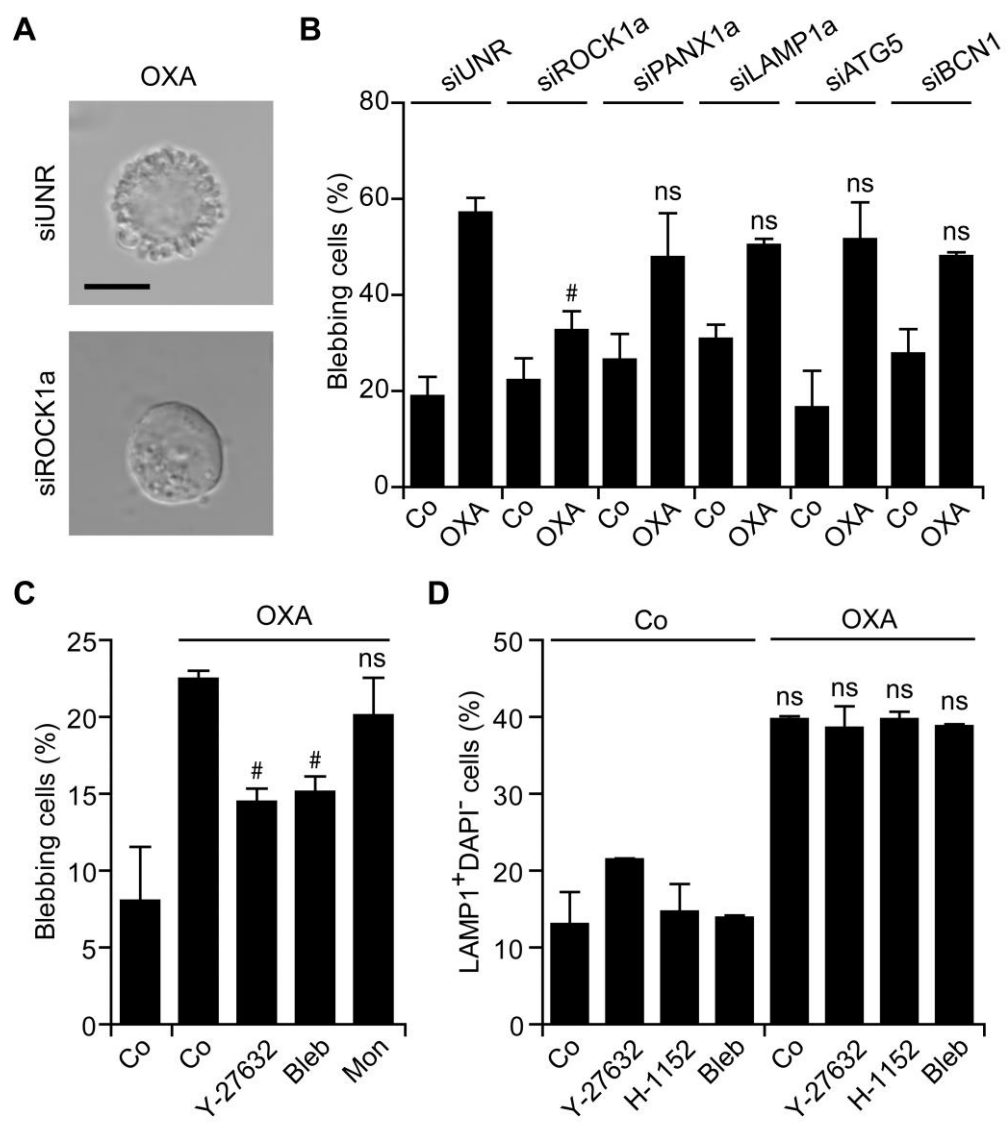
**Suppl. Figure 7**



Suppl. Figure 8



Suppl. Figure 9



Suppl. Figure 10

## Legends to Supplementary Figures

**Supplementary Figure 1. Response of autophagy-competent versus autophagy-deficient cells to immunogenic chemotherapy.** **A.** Murine fibrosarcoma MCA205 cells stably transfected with a scrambled shRNA (SCR) or a shRNA targeting Atg5 (Atg5<sup>KD</sup>) were maintained in control conditions (Co) or treated with 4  $\mu$ M mitoxantrone (MTX) or 1  $\mu$ M rapamycin (RAPA) for the indicated time, and then processed for the cytofluorometric detection of phosphatidylserine externalization (with FITC-conjugated AnnexinV, green fluorescence) and cell death-associated plasma membrane permeabilization (with propidium iodide, PI, red fluorescence). Quantitative data (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported. \* $p$ <0.05 (Student's  $t$  test), as compared to untreated SCR cells; ns = not significant (Student's  $t$  test), as compared to equally treated SCR cells. **B.** Human osteosarcoma U2OS cells stably expressing a GFP-LC3 chimera were transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with a siRNA specific for ATG5 for 48 hrs, and then treated as in **A**. Finally, the GFP-LC3 aggregation was monitored by fluorescence microscopy. The % of cells displaying cytoplasmic GFP-LC3<sup>+</sup> dots (GFP-LC3<sup>vac</sup> cells) is reported (means  $\pm$  SEM, n = 3). \* $p$ <0.05 (Student's  $t$  test), as compared to untreated siUNR-transfected cells; # $p$ <0.05 (Student's  $t$  test), as compared to equally treated siUNR-transfected cells.

**Supplementary Figure 2. Intracellular ATP levels in autophagy-competent versus autophagy-deficient cells.** **A-D.** Human osteosarcoma U2OS cells transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with siRNAs specific for ATG5 or ATG7 for 48 hrs as well as murine colon carcinoma CT26 cells stably transfected with a scrambled shRNA (SCR) or with shRNAs targeting Atg5 (Atg5<sup>KD</sup>) or Atg7 (Atg7<sup>KD</sup>) were lysed and processed either for the immunoblotting-assisted detection of ATG5 and ATG7 (**A,B**) or for the quantification of intracellular ATP levels by means of a luciferase-based assay (**C,D**). Representative

immunoblots and quantitative data (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported. GAPDH levels were monitored to ensure equal lane loading. ns, non significant (Student's *t* test), as compared to siUNR-transfected (C) or SCR (D) cells.

**Supplementary Figure 3. Alternative method for the detection of ATP release by cancer cells responding to immunogenic chemotherapy. A,B.** Human osteosarcoma U2OS cells were maintained in control conditions (Co) or treated with 60  $\mu$ M Y-27632, 10  $\mu$ M blebbistatin (Bleb), 5  $\mu$ M monensin (Mon), 10  $\mu$ M 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) and 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk (Z-VAD-fmk), alone or combined with 4  $\mu$ M mitoxantrone (MTX), for 18 hrs, and then co-stained for the cytofluorometric detection of ATP levels (with BODIPY-ATP, green fluorescence) and apoptotic plasma membrane permeabilization (with DAPI, blue fluorescence). Representative dot plots and quantitative data (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported. #*p*<0.05, ##*p*<0.01 (Student's *t* test), as compared to cells treated with MTX only.

**Supplementary Figure 4. Pharmacological inhibition of immunogenic cell death-associated ATP release.** Human osteosarcoma U2OS cells were maintained in control conditions (Co) or treated with 1, 5 or 10  $\mu$ M carbenoxolone disodium salt (CBX), 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (GRA), *N*-ethylmaleimide (NEM), lanthanum (III) chloride (LaCl<sub>3</sub>), probenecid (PROB) or flufenamic acid (FFA), alone or combined with 4  $\mu$ M mitoxantrone (MTX), for 24 hrs, followed by the quantification of ATP secretion in culture supernatants. Quantitative data (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported. #*p*<0.05 (Student's *t* test), as compared to cells treated with MTX only.

**Supplementary Figure 5. Genetic inhibition of immunogenic cell death-associated ATP release. A,B.** Human osteosarcoma U2OS cells were transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with siRNAs specific for ROCK1 (A,D), PAX1 (B,C,E) or SLC17A9 (A,F) for

48 hrs. Then, cells were either processed for the immunoblotting-assisted detection of ROCK1 and SLC17A9 (A) or optionally treated with 300  $\mu$ M oxaliplatin (OXA) (B,C) or 4  $\mu$ M mitoxantrone (MTX) (D-F) for additional 18 hrs and processed for the fluorescence microscopy-assisted visualization of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence) and cell surface-exposed PANX1 (with a specific antibody revealed in green) (B,C) or the cytofluorometric quantification of ATP-containing vesicles (with quinacrine, green fluorescence) (D,E). Alternatively, the concentration of ATP in culture supernatants was quantified by a luciferase-based test (F). Panel A depicts representative immunoblots ( $\beta$  actin and GAPDH levels were monitored to ensure equal lane loading). Panel B illustrates representative immunofluorescence microscopy images (scale bar = 10  $\mu$ m). Panels C, D and E show the % of cells exhibiting  $\geq 3$  PANX1 dots (means  $\pm$  SEM, n > 100 cells) (C) and the % of ATP-depleted (quinacrine<sup>low</sup>) cells (means  $\pm$  SEM, n = 3) (D,E). In panel F, extracellular ATP levels (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported. #p<0.05 (Student's t test), as compared to siUNR-transfected cells treated with OXA or MTX only.

**Supplementary Figure 6. No effect of ATP release blockers on immunogenic cell death characteristics and autophagy. A-D.** Wild-type human osteosarcoma U2OS cells or U2OS cells engineered for the stable expression of calreticulin (CRT)-GFP, histone 2B (H2B)-RFP, high-mobility group box 1 (HMGB1)-GFP or LC3-GFP chimeras, alone or in the indicated combinations, were maintained in control conditions (Co) or treated with 60  $\mu$ M Y-27632, 2  $\mu$ M H-1152, 10  $\mu$ M blebbistatin (Bleb), 10  $\mu$ M 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) and 1  $\mu$ M rapamycin (RAPA), alone or combined with 300  $\mu$ M oxaliplatin (OXA), for 24 or 48 hrs, as indicated. Thereafter, cells were processed for the fluorescence microscopy-assisted visualization of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence), ATP-containing vesicles (with quinacrine, green fluorescence) and/or fluorescent chimeras (emitting in red or green). Representative images (scale bar = 10  $\mu$ m) and quantitative data on

ATP secretion, CRT exposure, HMGB1 release, nuclear apoptosis and the % of cells displaying cytoplasmic GFP-LC3<sup>+</sup> dots (GFP-LC3<sup>vac</sup> cells) (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported. # $p$ <0.05, ns = non significant (Student's  $t$  test), as compared to OXA-treated cells of the same type.

**Supplementary Figure 7. Impact of ATP release inhibitors on the immunogenicity of cell death. A-C.** Murine colon carcinoma CT26 or murine fibrosarcoma MCA205 cells were left in control conditions or incubated with 30  $\mu$ M Y-27632, 2  $\mu$ M H-1125, 50  $\mu$ M blebbistatin (Bleb), 10  $\mu$ M 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) or 10  $\mu$ M 4-acetamido-4-isothiocyano-stilbene-2,2-disulfonic acid (SITS) for 4 hrs, followed by the administration of 2  $\mu$ M or 1  $\mu$ M mitoxantrone (MTX), respectively, for additional 24 hrs. Thereafter, dying CT26 or MCA205 cells were inoculated *s.c.* in BALB/c (**A,C**) or C57BL/6 (**B,C**) mice, respectively. In both cases, an equivalent volume of PBS was administered as a negative control condition. Mice were re-challenged 7 days later with living cells of the same type and tumor incidence was monitored over time. Representative Kaplan-Meier curves and quantitative results (means, number of animals indicated) as observed at day 50 post-re-challenge are reported. # $p$ <0.05 (log-rank test), as compared to animals receiving MTX-treated cells. ND, not determined.

**Supplementary Figure 8. PANX1 channels and autophagy operate independently from each other. A,B.** Human osteosarcoma U2OS cells transiently transfected with a construct for the constitutive overexpression of Flag-tagged truncated PANX1 (tPANX1) or mock-transfected were processed for the immunofluorescence microscopy-assisted visualization of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence) and tPANX1 on the cell surface (revealed with a secondary antibody emitting in green) (**A**) or for the immunoblotting-mediated detection of tPANX1 (with a Flag-specific antibody) (**B**). Representative images (scale bar = 10  $\mu$ m) and representative immunoblots are reported.  $\beta$  actin levels were monitored to ensure



equal lane loading. **C,D.** U2OS cells were transiently transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with siRNAs specific for the indicated autophagic factors, in combination with either a tPANX1-coding construct or a mock transfection for 24 hrs. Thereafter, cells were processed for the cytofluorometric assessment of PANX1 activation (with YO-PRO<sup>®</sup>-1, green fluorescence) and cell death-associated plasma membrane permeabilization (with DAPI, blue fluorescence) (**C**), whereas ATP levels in culture supernatants were quantified by means of a luciferase-based assay (**D**). Quantitative data (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported. ns = non significant (Student's *t* test), as compared to siUNR-transfected, tPANX1-expressing cells.

**Supplementary Figure 9. Co-localization between ATP-containing vesicles and proteolytic cell compartments.** Human osteosarcoma U2OS cells were maintained in control conditions (Co) or incubated with 75 or 150  $\mu$ M oxaliplatin (OXA) for 18 hrs, and then processed for the fluorescence microscopy-assisted visualization of nuclei (with Hoechst 33342, blue fluorescence), ATP-containing vesicles (with quinacrine, green fluorescence), proteolytic cell compartments (with DQ<sup>TM</sup> Red BSA) and lysosomes (with LysoTracker<sup>®</sup> Red). Representative images (scale bar = 10  $\mu$ m) and quantitative co-localization data (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported. \*\*\**p*<0.001 (Student's *t* test), as compared to cells maintained in Co conditions.

**Supplementary Figure 10. Crosstalk between the molecular machinery for blebbing and immunogenic cell death-associated ATP release. A-C.** Human osteosarcoma U2OS cells were transfected with a non-targeting siRNA (siUNR) or with siRNAs specific for the indicated proteins for 48 hrs, and then maintained in control conditions (Co) or treated with 600  $\mu$ M oxaliplatin (OXA) for additional 6 hrs. Alternatively, untransfected U2OS cells were treated with 30  $\mu$ M Y-27632, 10  $\mu$ M blebbistatin (Bleb) and 5  $\mu$ M monensin (Mon), alone or in combination with 600  $\mu$ M OXA for 6 hrs. Thereafter, cells were processed for the quantification of apoptotic cell blebbing by light microscopy. Representative images (scale

bar = 10  $\mu$ m) and quantitative data (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported). # $p$ <0.05, ns = non significant (Student's  $t$  test), as compared to siUNR-transfected (**B**) or untransfected (**C**) cells treated with OXA. **D.** U2OS cells were treated with 30  $\mu$ M Y-27632, 2  $\mu$ M H-1152, and 10  $\mu$ M blebbistatin (Bleb), alone or combined with 600  $\mu$ M OXA, for 18 hrs, followed by the cytofluorometric detection of LAMP1 at the cell surface (revealed with a secondary antibody emitting in red) and cell death-associated plasma membrane permeabilization (with DAPI, blue fluorescence). Quantitative data (means  $\pm$  SEM, n = 3) are reported). ns = non significant (Student's  $t$  test), as compared to cells treated with OXA only.

## 2. Identification de la chimiokine CXCL8 dans la voie d'exposition de la calréticuline.

Les résultats de l'article d'AQ Sukkurwala *et al* publiés dans *Cell Death and Differentiation* seront présentés ci-dessous. Il s'intitule « Immunogenic calreticulin exposure occurs through a phylogenetically conserved stress pathway involving the chemokine CXCL8 »

L'exposition de la calréticuline (CRT) à la surface cellulaire constitue une des caractéristiques de la mort cellulaire immunogène, facilitant le recrutement des DCs, de la phagocyte des cellules tumorales mourantes par ces dernières et ainsi d'induire la réponse T. Cependant les mécanismes impliqués restent méconnus. Dans le travail présenté ci-dessous, nous montrons que les phéromones peuvent agir comme inducteurs physiologiques de l'exposition de la CRT dans les cellules de levure.

La CRT est exposée physiologiquement à la surface des gamètes et facilite la fertilisation chez les mammifères. De façons similaires, nous avons pu observer que les cellules de *S. cerevisiae* présentant une délétion chez l'orthologue de la CRT (Cne1p) possèdent une efficacité de reproduction réduite quand elles sont en co-culture avec les cellules sauvages (WT) (fig 1a). Ces premiers résultats suggèrent que Cne1p facilite le rapprochement des cellules de sexe opposé mais n'intervient cependant pas dans leur fusion. Par des expériences de microscopie à fluorescence, nous avons observé qu'une mutation du facteur  $\alpha$ , qui est normalement une phéromone pour la reproduction, empêchait la relocalisation de Cne1p après un traitement par le MTX dans les cellules de levure (fig 1b). Nous avons observé une capacité similaire entre le facteur  $\alpha$  et la MTX à activer la relocalisation de Cne1p et à activer les voies de signalisation correspondantes. Ces résultats préliminaires prouvent que les phéromones de levure ont la capacité d'induire l'exposition de Cne1p, l'orthologue de la CRT, à la surface cellulaire pour stimuler la reproduction.

Il est connu que le facteur  $\alpha$  agit *via* un récepteur couplé à la protéine G (GPCR). Nous avons de ce fait évalué par marquage de surface cellulaire puis par cytométrie en flux ou par microscopie à fluorescence, la capacité de la toxine de la coqueluche (PTX) à inhiber l'exposition à la surface cellulaire de la CRT dans les cellules HeLa traitées au préalable

par la MTX. En effet, la PTX est connue pour être un inhibiteur à large spectre des GPCRs de mammifères. Comme montré dans les figures 2a et 2b, nous observons une grande capacité de la PTX à inhiber l'exposition de la CRT après un traitement par la MTX ou encore par les rayons UVC. Dans des expériences de vaccination de souris C57Bl/6, nous avons confirmé le fait que la PTX empêchait les cellules tumorales mourantes de conférer une mort cellulaire immunogène *in vivo*. En effectuant des recherches plus approfondies, notamment en inhibant différents GPCRs ainsi que leurs ligands grâce à des expériences de transfection avec les siRNAs correspondants, nous avons montré qu'une déplétion de CXCR1 et de son ligand CXCL8 (plus connu comme étant IL-8) inhibait l'exposition de la CRT normalement induite par le traitement des cellules HeLa par le MTX ou par les UVC (fig 2c). Le rôle essentiel de CXCL8 dans la translocation de la CRT à la surface cellulaire a été confirmé par un criblage d'une librairie de siRNA ciblant 250 protéines impliquées dans le stress et la mort cellulaire, sur des cellules U2OS traitées pendant 4h par MTX avant visualisation par microscopie à fluorescence automatisée (fig 3a et 3b). Par des expériences de cytométrie en flux, nous avons observé qu'un ajout de la protéine CXCL8 recombinante (rCXCL8), mais pas la protéine CXCL2 recombinante, à nos cultures cellulaires de HeLa suffit à induire l'exposition de la CRT à la surface cellulaire, de manière aussi efficace que la MTX. Cet effet est annulé lorsque nous traitons nos cellules par le Z-VAD-fmk (fig 3c à 3e). De façon attendue, nous avons observé par cytométrie en flux, que la déplétion de la kinase PERK, de son substrat eIF2 $\alpha$ , de BAX et BAK (surtout quand ils sont déplétés tous les deux) et des SNAREs, SNAP25 et VAMP1, inhibent la translocation de la CRT à la surface membranaire induite par rCXCL8 (fig 3f). Mais nous n'avons observé aucun effet suite à la déplétion de facteur essentiel pour l'autophagie BCN1. Des études de la protéine chimère LC3-GFP (caractéristiques des autophagosomes) par microscopie fluorescente ne montrent aucun effet de l'ajout de rCXCL8 sur l'autophagie. Il n'y a également aucun effet sur la libération d'ATP.

Nous nous sommes ensuite posés la question de savoir si le knockdown du récepteur murin pour Cxcl2 (orthologue murin de CXCL8), à savoir Cxcr1 et Cxcr2, pouvait annuler l'immunogénicité de la mort cellulaire induite par la MTX dans des expériences *in vivo*. En effet, des résultats préliminaires ont montré que le knockdown de Cxcr1 et Cxcr2 n'affectaient pas la capacité de la MTX à induire la mort cellulaire *in vitro*, mais limite sa capacité à induire la translocation de la CRT vers la membrane plasmique. Pour cela,

nous avons réalisé des expériences de vaccination sur des souris immunocompétentes avec des cellules CT26 et MCA205, qui ont été au préalable transfectées ou non avec les siRNA ciblant Cxcr1 ou Cxcr2 puis traitées pendant 24h avec la MTX. Nous avons observé une augmentation significative du nombre de souris ayant développé une tumeur dans les groupes ayant eu pour vaccination les cellules tumorales mourante déficientes pour Cxcr1 et Cxcr2. Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse de la contribution importante de la voie de signalisation de CXCL8 dans l'exposition de la CRT induite par les anthracyclines.

Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que si CXCL8 et ses récepteurs étaient nécessaires à l'exposition de la CRT à la surface cellulaire suite à une chimiothérapie immunogénique, alors les cellules cancéreuses traitées par MTX produiraient assez de CXCL8 pour que celui-ci ait une action autocrine ou paracrine. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé des tests ELISA pour mesurer le niveau de CXCL8 produit dans les cellules HeLa et HCT116, qui sont des cellules de carcinomes colorectales, traitées par MTX et par cisplatine. Nous avons pu observer un niveau significativement élevé de CXCL8 produit quand les cellules sont traitées par la MTX, mais pas par la cisplatine (fig 5a et 5b). Ces résultats ont été validés par des expériences d'ELISA mesurant la quantité de Cxcl2 produite dans les cellules murines MCA205 et dans des fibroblastes embryonnaires de souris suite à un traitement par la MTX ou par la cisplatine (fig 5c et 5d). Nous avons également montré que la sécrétion de CXCL8 se faisait bien avant l'apoptose précoce.

Pour valider *in vivo* nos résultats, nous avons réalisé des études de profil du transcriptome. Pour cela, nous avons injecté des cellules CT26 ou MCA205 à des souris BALB/c et C57Bl/6 respectivement, et une fois que les tumeurs ont été palpables, nous avons traité ces souris par deux chimiothérapies : MTX ou OXA d'une part, et cisplatine d'autre part. 6 heures ou 12 heures suivant le traitement, nous avons prélevé la tumeur et procédé à des analyses de RT-PCR quantitatives. Ces analyses ont révélé que la mort cellulaire immunogénique était précédée par l'activation transcriptionnelle de Cxcl2 (fig 5e). Nous avons donc pu en conclure que les inducteurs de mort immunogénique dans le cadre d'une chimiothérapie stimule la production de Cxcl2 *in vivo*.

En nous basant sur les précédents résultats qui ont montré que la cisplatine et la mitomycine C étaient incapables d'induire une mort cellulaire immunogénique, dû à leur incapacité à stimuler la translocation de la CRT à la surface cellulaire (Martins, Kepp et

al. 2011), nous avons voulu savoir si un ajout externe de rCxcl2 pouvait compenser cette incapacité, et de ce fait, rendre la cisplatine et la mitomycine C équivalents aux inducteurs de mort cellulaire immunogénique. Pour ce faire, des cellules MCA205 ont été traitées avec le cisplatine ou la mytomycine C, seules ou en combinaison avec rCxcl2, puis injectées en sous-cutané dans les souris C57Bl/6 pour tester leur capacité à proférer une réponse immunitaire anti-tumorale protectrice. Nous avons observé que rCxcl2 n'augmentait pas le pourcentage de cellules mortes après traitement par la cisplatine ou la mitomycine C, mais la combinaison des deux augmente significativement la protection anti-tumorale des souris lors de la réinjection de cellules cancéreuses comparé au traitement par chimiothérapie seule (fig 6a à 6f). Un tel effet immunoprotecteur est inhibé quand la CRT est déplétée par utilisation de siRNA. Ces résultats indiquent donc que le CXCL8, ayant pour orthologue Cxcl2, peut stimuler une réponse immunologique dans le cadre d'une chimiothérapie.

# Immunogenic calreticulin exposure occurs through a phylogenetically conserved stress pathway involving the chemokine CXCL8

AQ Sukkurwala<sup>1,2,3,13</sup>, I Martins<sup>1,2,3,13</sup>, Y Wang<sup>1,2,3</sup>, F Schlemmer<sup>1,2,3</sup>, C Ruckenstein<sup>4</sup>, M Durchschlag<sup>4</sup>, M Michaud<sup>1,2,3</sup>, L Senovilla<sup>2,3,5</sup>, A Sistigu<sup>2,3,5</sup>, Y Ma<sup>1,2,3</sup>, E Vacchelli<sup>1,2,3</sup>, E Sulpice<sup>6,7</sup>, X Gidrol<sup>6,7</sup>, L Zitvogel<sup>2,3,5,8</sup>, F Madeo<sup>4</sup>, L Galluzzi<sup>1,9,14</sup>, O Kepp<sup>\*,1,2,3,14</sup> and G Kroemer<sup>\*,1,9,10,11,12,14</sup>

The exposure of calreticulin (CRT) on the surface of stressed and dying cancer cells facilitates their uptake by dendritic cells and the subsequent presentation of tumor-associated antigens to T lymphocytes, hence stimulating an anticancer immune response. The chemotherapeutic agent mitoxantrone (MTX) can stimulate the peripheral relocation of CRT in both human and yeast cells, suggesting that the CRT exposure pathway is phylogenetically conserved. Here, we show that pheromones can act as physiological inducers of CRT exposure in yeast cells, thereby facilitating the formation of mating conjugates, and that a large-spectrum inhibitor of G protein-coupled receptors (which resemble the yeast pheromone receptor) prevents CRT exposure in human cancer cells exposed to MTX. An RNA interference screen as well as transcriptome analyses revealed that chemokines, in particular human CXCL8 (best known as interleukin-8) and its mouse ortholog Cxcl2, are involved in the immunogenic translocation of CRT to the outer leaflet of the plasma membrane. MTX stimulated the production of CXCL8 by human cancer cells *in vitro* and that of Cxcl2 by murine tumors *in vivo*. The knockdown of CXCL8/Cxcl2 receptors (CXCR1/Cxcr1 and Cxcr2) reduced MTX-induced CRT exposure in both human and murine cancer cells, as well as the capacity of the latter on exposure to MTX to elicit an anticancer immune response *in vivo*. Conversely, the addition of exogenous Cxcl2 increased the immunogenicity of dying cells in a CRT-dependent manner. Altogether, these results identify autocrine and paracrine chemokine signaling circuitries that modulate CRT exposure and the immunogenicity of cell death.

Cell Death and Differentiation (2014) 21, 59–68; doi:10.1038/cdd.2013.73; published online 21 June 2013

Chemotherapy is thought to mediate antineoplastic effects either by directly inhibiting the proliferation or by triggering the (most often apoptotic) death of cancer cells.<sup>1</sup> Nonetheless, at least some anticancer agents display an optimal efficacy in the presence of an intact immune system, but not when mice lack T cells, dendritic cells (DCs), several other effectors of innate and adaptive immunity or when they are treated with a CD11b-specific antibody that blocks the extravasation of DC precursors.<sup>2–6</sup> These results point to a hitherto poorly understood role for anticancer immune responses in determining the long-term success of chemotherapy, a notion that is in line with abundant clinical data indicating that tumor infiltration by cytotoxic T lymphocytes influences disease outcome.<sup>7–10</sup>

Cancer cells respond to some chemotherapeutics such as anthracyclines and oxaliplatin by undergoing an immunogenic form of cell death, meaning that such dying cells become able to induce a potent cellular immune response on subcutaneous injection into immunocompetent mice.<sup>1,5,11</sup> However, cell death as induced by many other agents including mitomycin C and cisplatin is unable to elicit such an anticancer immune response *in vivo*,<sup>12–14</sup> pointing to major differences in the capacity of distinct agents to promote immunogenic cell death (ICD).

One of such differences stems from the fact that only ICD inducers are capable of triggering the pre-apoptotic exposure of calreticulin (CRT) on the outer leaflet of the

<sup>1</sup>INSERM, U848, Villejuif, France; <sup>2</sup>Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>3</sup>Université Paris Sud/Paris XI, Le Kremlin Bicêtre, France; <sup>4</sup>Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, Graz, Austria; <sup>5</sup>INSERM, U1015 Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Villejuif, France; <sup>6</sup>Laboratoire Biologie à Grande Echelle, CEA, Grenoble, France; <sup>7</sup>INSERM, U1038, Université Joseph Fourier, Grenoble, France; <sup>8</sup>Centre d'Investigation Clinique Biothérapie CICBT507, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>9</sup>Université Paris Descartes/Paris V, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>10</sup>Metabolomics Platform, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>11</sup>Equipe 11 Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France and <sup>12</sup>Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

\*Corresponding author: G Kroemer or O Kepp, INSERM U848, Institut Gustave Roussy, Pavillon de Recherche 1, 39 rue Camille Desmoulins, F-94805, Villejuif, France. Tel: +33 1 4211 6046; Fax: +33 1 4211 6047; E-mail: kroemer@orange.fr or oliver.kepp@igr.fr

<sup>13</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>14</sup>These authors share senior co-authorship.

**Keywords:**  $\alpha$  factor; autophagy; apoptosis; BAX; endoplasmic reticulum stress; PERK

**Abbreviations:** BCG, bacillus Calmette-Guérin; CFU, colony-forming unit; CRT, calreticulin; DC, dendritic cell; eIF2 $\alpha$ , eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ ; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ER, endoplasmic reticulum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GFP, green fluorescent protein; GPCR, G protein-coupled receptor; ICD, immunogenic cell death; IL-8, interleukin-8; mTOR, mammalian target of rapamycin; MTX, mitoxantrone; PDIA3, protein disulfide isomerase family A, member 3; PI, propidium iodide; PERK, PKR-like ER kinase; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; r, recombinant; PTX, pertussis toxin; RFP, red fluorescent protein; SC, synthetic complete; siRNA, small-interfering RNA; SNARE, SNAP receptor; WT, wild-type; YEPD, yeast extract peptone dextrose

Received 29.1.13; revised 17.5.13; accepted 28.5.13; Edited by M Piacentini; published online 21.6.13

plasma membrane.<sup>14</sup> Cell surface-exposed CRT operates as a potent 'eat-me' signal, facilitating the engulfment of dying cells and apoptotic debris by macrophages and DCs.<sup>14,15</sup> CRT is the most abundant soluble protein of the endoplasmic reticulum (ER) and translocates to the cell surface only in the context of an ER stress response involving the phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) by eIF2 $\alpha$  kinase 3 (EIF2AK3, best known as PKR-like ER kinase, PERK).<sup>16</sup> In line with this notion, lethal stimuli that fail to elicit sufficient degrees of ER stress (such as mitomycin C and cisplatin) cannot induce the immunogenic exposure of CRT on the cell surface, unless an exogenous source of ER stress is provided.<sup>13,17,18</sup> In contrast, anthracyclines and oxaliplatin are highly efficient at stimulating the PERK-mediated phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , followed by the caspase-8-mediated cleavage of BCAP31, BAX/BAK activation (presumably at the ER membrane), the anterograde transport of CRT-containing vesicles from the ER to the cell surface (via the Golgi apparatus), and – eventually – the SNAP receptor (SNARE)-dependent fusion of such vesicles with the plasma membrane.<sup>5,16</sup> In response to some (but not all) ICD inducers, protein disulfide isomerase family A, member 3 (PDIA3), an ER reticulum chaperone best known as ERp57, is required for the translocation of (and *de facto* physically escorts) CRT to the outer leaflet of the plasma membrane.<sup>5,16,17</sup> The current literature suggests that the molecular mechanisms accounting for CRT exposure are highly complex and require further in-depth analysis.<sup>17,19,20</sup>

Extracellular CRT is not only of immunological relevance. Indeed, CRT has been detected at the surface of capacitated spermatocytes and oocytes,<sup>21,22</sup> and circumstantial evidence indicates that CRT contributes to the fusion of gametes and fertility, both in mammals and in nematodes.<sup>23,24</sup> Interestingly, anthracyclines can stimulate the relocalization of Cne1p, the yeast ortholog of CRT, to the periphery of *Saccharomyces cerevisiae* cells, and genetic studies indicate that the mechanisms that regulate this process in mammals and yeast may be similar.<sup>25</sup> Several unicellular parasites have also been reported to expose CRT on their surface,<sup>26,27</sup> pointing to a broad phylogenetic conservation of the CRT exposure pathway.

Driven by these premises and incognita, we decided to reinvestigate the molecular mechanisms that underpin the immunogenic relocalization of CRT from the ER to the cell surface. Based on the initial observation that yeast pheromones induce CRT exposure to increase the formation of mating conjugates, we discovered that soluble factors regulate the translocation of CRT to the outer leaflet of the plasma membrane in mammalian cells as well. Here, we demonstrate that the chemokine CXCL8, best known as interleukin-8 (IL-8), regulates CRT exposure by binding to its cognate receptors CXCR1 and CXCR2, a finding that has broad implications for the therapeutic induction of ICD in cancer patients.<sup>28</sup>

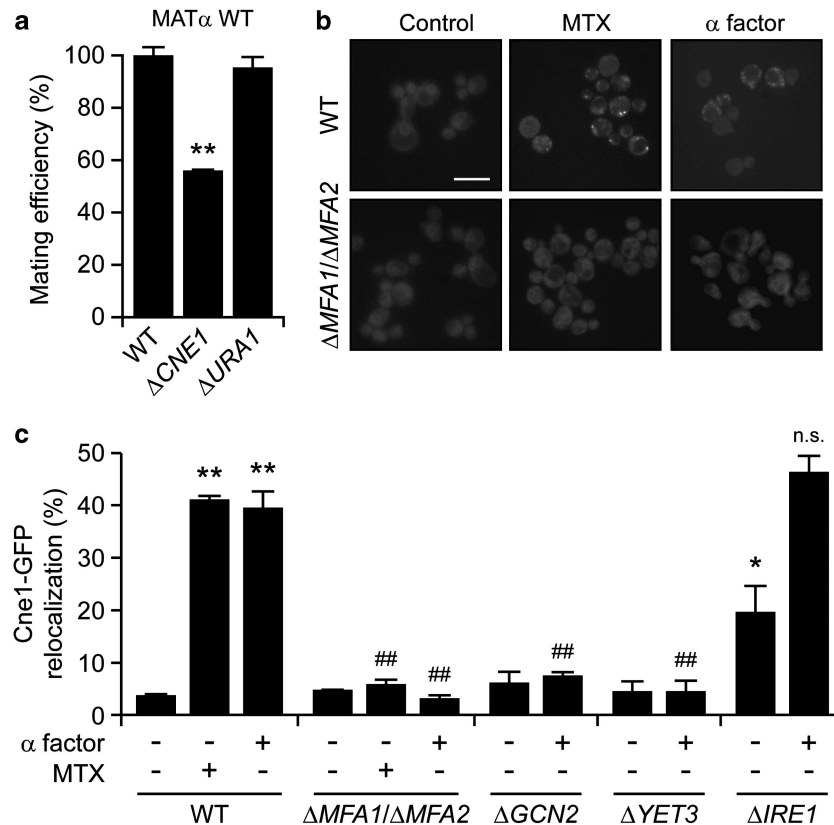
## Results

**Involvement of CRT exposure in yeast mating and pheromone signaling.** As discussed above, CRT is physiologically exposed on the surface of gametes and favors

fertilization in mammals.<sup>21,22,24</sup> Along similar lines, *S. cerevisiae* cells lacking the yeast ortholog of CRT (Cne1p), but not dihydroorotate dehydrogenase (Ura1p), exhibited a reduced mating efficiency when they were co-cultured with wild-type (WT)  $\alpha$  cells (Figure 1a). This phenotype was observed in rocking cultures but not in still media (data not shown), suggesting that Cne1p facilitates the conjugation of cells with opposed sexes, not their fusion. In conditions in which WT yeast cells manifested the mitoxantrone (MTX)-induced peripheral relocation of vesicles bearing a green fluorescent protein (GFP)-tagged variant of Cne1p (Cne1-GFP), cells lacking two subunits of the mating pheromone  $\alpha$  factor (i.e., Mfa1 and Mfa2) failed to do so (Figure 1b).<sup>25</sup> MTX and the  $\alpha$  factor triggered the peripheral relocalization of Cne1-GFP with a comparable potency and activated similar signaling pathways. Indeed, the knockout of genes coding for the yeast orthologs of PERK and BCAP31, namely *gcn2* and *yet3*, similarly reduced the relocalization of Cne1-GFP to the cell periphery as triggered by the  $\alpha$  factor (Figure 1c) and MTX.<sup>25</sup> Of note, the knockout of *IRE1*, coding for a protein involved in the management of ER stress,<sup>29</sup> induced *per se* some extent of Cne1-GFP relocalization but did not affect the ability of the  $\alpha$  factor to do so (Figure 1c). Altogether, these results suggest that yeast pheromones can induce the exposure of the CRT ortholog Cne1p on the cell surface to stimulate mating.

**Essential role of IL-8 in chemotherapy-induced CRT exposure.** The  $\alpha$  factor signals through a G protein-coupled receptor (GPCR).<sup>30</sup> We therefore evaluated the capacity of the pertussis toxin (PTX), a large-spectrum inhibitor of mammalian GPCRs,<sup>31</sup> to inhibit MTX-induced CRT exposure in cervical carcinoma HeLa cells. PTX was indeed highly efficient at suppressing CRT exposure by HeLa cells responding to MTX or UVC light, as determined by surface immunostaining and flow cytometry or fluorescence microscopy (Figures 2a and b). In line with this notion, PTX compromised the ability of MTX to induce *bona fide* ICD in murine MCA205 fibrosarcoma cells, as assessed by specific vaccination assays *in vivo* (Supplementary Figure S1). Next, we downregulated several GPCRs and their ligands by means of specific small-interfering RNAs (siRNAs) and found that the depletion of CXCR1 and its ligand CXCL8 (best known as IL-8) inhibit CRT exposure as triggered in HeLa cells by both MTX and UVC light (Figure 2c). These results were confirmed by a screen in which we evaluated a siRNA library to identify genes that are required for CRT exposure, validating the essential role of CXCL8 in the immunogenic translocation of CRT to the cell surface (Figures 3a and b). In a further series of experiments, we determined whether CXCL8 would be sufficient to induce CRT exposure on human cancer cells. Indeed, recombinant CXCL8 (rCXCL8), but not rCXCL2, promoted the exposure of CRT on the surface of HeLa cells in a time and dose-dependent manner as efficiently as MTX did, an effect that was blocked by the broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk (Figures 3c–e) as well as by siRNA-mediated depletion of caspase-8 (Supplementary Figure S2). The depletion of several other factors that have previously been shown to be required for CRT exposure as induced by MTX<sup>16</sup> also inhibited the





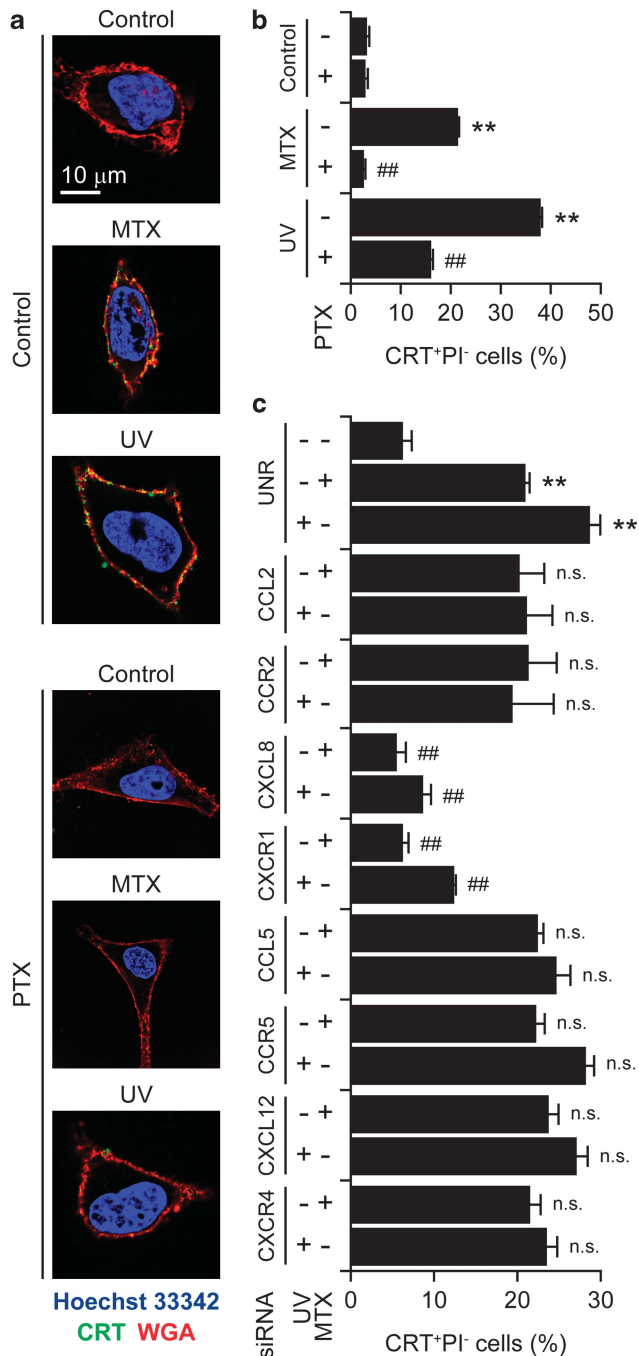
**Figure 1** Impact of the yeast  $\alpha$  factor on Cne1p exposure and mating. (a) Relative mating efficiency of WT *Saccharomyces cerevisiae* MAT $\alpha$  BY4742 cells co-cultured with WT,  $\Delta cne1$  or  $\Delta ura1$  MAT $\alpha$  BY4741 cells, as determined via clonogenic mating assay. Mating efficiency of WT BY4741 cells was set to 100%. Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 3$ ; \*\* $P < 0.01$ , as compared with WT BY4741 cells). (b and c) Exponentially growing WT,  $\Delta mfa1/\Delta mfa2$ ,  $\Delta gcn2$ ,  $\Delta yet3$  or  $\Delta ire1$  BY4741 cells expressing Cne1-GFP were left untreated or treated with 10  $\mu$ M MTX or 100  $\mu$ M  $\alpha$  factor for 4 h, followed by the assessment of Cne1-GFP localization by fluorescence microscopy. Representative pictures (scale bar = 10  $\mu$ m) and quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.;  $n = 3$ , with  $\geq 1000$  cells per sample; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , as compared with untreated WT cells; ## $P < 0.01$ , NS = non significant, as compared with equally-treated WT cells) are reported in panels (b) and (c), respectively

translocation of CRT to the outer leaflet of the plasma membrane as stimulated by rCXCL8. In particular, this applied to the ER stress kinase PERK, its substrate eIF2 $\alpha$ , the pro-apoptotic BCL-2 family members BAX and BAK (especially when co-depleted) as well as to the SNAREs SNAP25 and VAMP1 (Figure 3f). Conversely, CRT exposure by HeLa cells responding to rCXCL8 was not influenced by the depletion of the essential autophagic factor Beclin 1 (Supplementary Figure S2). Moreover, HeLa cells exposed to rCXCL8 did not manifest signs of autophagy, such as the aggregation of a fluorescent GFP-LC3 chimera into cytoplasmic dots, nor did they release ATP (Supplementary Figure S3). These data indicate that CXCL8 stimulates CRT exposure by a mechanism that does involve autophagy and the ICD-associated, autophagy-dependent ATP release. Rather, CXCL8 appears to activate a CRT exposure pathway that largely overlaps with that ignited by immunogenic chemotherapy.

As CXCL8 turned out to be required for the exposure of CRT triggered by anthracyclines, we wondered whether the knockdown of the murine receptors for Cxcl2 (the murine CXCL8 ortholog), i.e., Cxcr1 and Cxcr2, would impair the immunogenicity of MTX-induced cell death. To address this question, murine CT26 colon carcinoma or MCA205

fibrosarcoma cells were subjected to the siRNA-mediated downregulation of Cxcr1 or Cxcr2, treated with MTX for 24 h, and then used in vaccination experiments. In this setting, the knockdown of Cxcr1 or Cxcr2 did not affect the ability of MTX to kill cancer cells, yet limited its capacity to stimulate the exposure of CRT on the plasma membrane (data not shown). For vaccination experiments, dying CT26 and MCA205 cells were injected s.c. into the flank of histocompatible, immuno-competent mice (BALB/c and C57Bl/6 animals, respectively), which were re-challenged 1 week later with live, untreated cells of the same type. Of note, the knockdown of Cxcr1 or Cxcr2 significantly reduced the capacity of dying tumor cells to elicit a protective immune response (Figure 4). These results underscore the contribution of the CXCL8 signaling pathway to CRT exposure induced by anthracyclines such as MTX.

**Production of CXCL8 by cancer cells in response to chemotherapy.** If CXCL8 and its receptors were required for the exposure of CRT on the cell surface in response to immunogenic chemotherapy, one would expect that MTX-treated cancer cells produce CXCL8 in amounts that suffice to elicit autocrine/paracrine signaling pathways. Indeed, both cervical carcinoma HeLa cells and colorectal carcinoma HCT 116 cells responding to MTX (but not to cisplatin) produced



**Figure 2** Contribution of chemokine signaling to CRT exposure as triggered by ICD inducers. (a and b) Human cervical carcinoma HeLa cells were treated with 100 ng/ml PTX for 30 min and washed extensively (a and b). Alternatively, HeLa cells were transfected with a control siRNA (UNR) or with siRNA targeting the indicated chemokines and chemokine receptors for 48 h (c). Thereafter, cells were treated with either 1  $\mu$ M MTX or 100 J/cm<sup>2</sup> UVC light and – 4 h later – processed for the confocal microscopy-assisted (a) or flow cytometry-assisted (b and c) detection of surface-exposed CRT. Representative pictures (scale bar = 10  $\mu$ m) and quantitative data on the percentage of live (excluding PI, PI<sup>-</sup>) cells exposing CRT on their surface (means  $\pm$  S.E.M.;  $n = 3$ ; \*\* $P < 0.01$ , as compared with untransfected or UNR-transfected untreated cells; ## $P < 0.01$ , NS = non significant, as compared with untransfected cells treated with MTX or UV only, or to equally treated UNR-transfected cells) are reported in panels (a) and (b and c) respectively

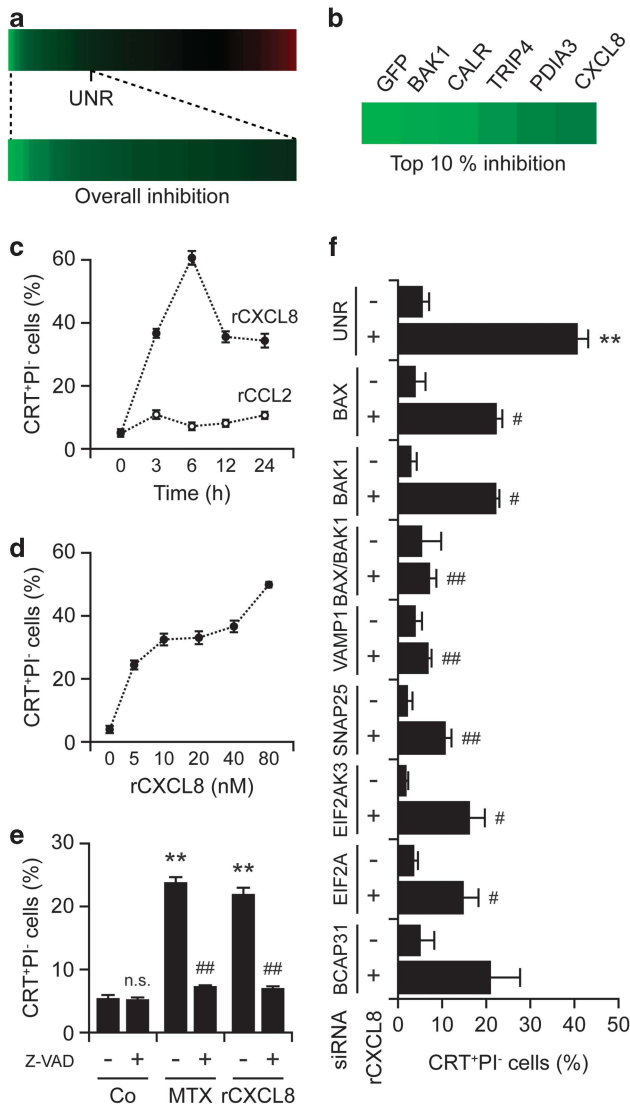
significant levels of CXCL8, as monitored by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Figures 5a and b). Along similar lines, both murine MCA205 fibrosarcoma cells and mouse embryonic fibroblasts secreted the mouse CXCL8 ortholog Cxcl2 following the administration of MTX, but not of cisplatin (Figures 5c and d). Of note, CXCL8 secretion by HeLa cells responding to MTX occurred well before early (i.e., exposure of phosphatidylserine residues on cell surface) and late (i.e., permeabilization of the plasma membrane) manifestations of apoptosis<sup>32</sup> (Supplementary Figure S4).

Next, to investigate the possible relevance of these observations *in vivo*, we performed a vast transcriptome profiling study on CT26 carcinomas and MCA205 fibrosarcomas growing on BALB/c and C57Bl/6 mice, respectively. In this setting, tumor-bearing mice received a systemic chemotherapeutic regimen based on either of two distinct ICD inducers, MTX and oxaliplatin, or on cisplatin, which we used as an internal control. At 6 or 12 h following chemotherapy, tumors were excised and subjected to quantitative RT-PCR analyses to determine the expression levels of multiple immunologically relevant factors, including a broad collection of chemokines. These analyses revealed that immunogenic (but not non-immunogenic) cell death is preceded by the transcriptional activation of *Cxcl2* (Figure 5e). Hence, chemotherapy with ICD inducers can stimulate the production of the murine CXCL8 ortholog Cxcl2 *in vivo*.

**Enhanced immunogenicity of cell death in the presence of the CXCL8 ortholog Cxcl2.** Cisplatin and mitomycin C are unable to induce ICD, correlating with their incapacity to stimulate the translocation of CRT to the cell surface.<sup>12–14</sup> Based on the aforementioned results, we wondered whether the exogenous administration of rCxcl2 might compensate for this defect and hence convert cisplatin and mitomycin C into ICD inducers. To address this question, MCA205 fibrosarcoma cells were treated with cisplatin or mitomycin C, alone or in combination with rCxcl2, and then injected subcutaneously into C57Bl/6 mice to test their capacity to elicit a protective antitumor immune response. Of note, rCxcl2 did not increase the percentage of MCA205 cells succumbing to cisplatin or mitomycin C (Supplementary Figure S5). However, the combination of rCxcl2 and cisplatin or mitomycin C was far more efficient at triggering ICD than either chemotherapeutic alone (Figures 6a–f). Such an immunogenic effect was lost when CRT was depleted by siRNAs, underscoring its essential contribution. Altogether, these findings indicate that the CXCL8 ortholog Cxcl2 can stimulate ICD in the context of chemotherapy.

## Discussion

The pre-apoptotic exposure of CRT at the cell surface has emerged as an important hallmark of ICD, meaning that it can predict – at least in part – the capacity of dying cells to elicit a protective anticancer immune response, both in rodent models<sup>2,13,14,17,18,33,34</sup> and in patients.<sup>35–37</sup> Here, we report the unexpected finding that CRT exposure is regulated not only by cell-intrinsic mechanisms, but also by soluble factors that operate in an autocrine/paracrine manner.



**Figure 3** Autocrine/paracrine CXCL8 signaling and CRT exposure. (**a** and **b**) Human osteosarcoma U2OS cells stably expressing CRT-GFP were reverse-transfected with a control siRNA (UNR) as well as with a panel of siRNA targeting 250 proteins involved in cell stress and cell death signaling for 48 h, followed by the administration of 1  $\mu$ M MTX for additional 4 h and the automated fluorescence microscopy-assisted acquisition of images for the assessment of CRT-GFP exposure. The modulation of CRT-GFP exposure is depicted in a color code (green = reduction, red = increase), and the siRNAs mediating inhibitory effects in the top 10 percentile are listed. (**c–e**) Human cervical carcinoma HeLa cells were treated with 80 ng/ml rCXCL8 or rCCL2 for the indicated time (**c**) or with the indicated concentrations of rCXCL8 for 8 h (**d**). Alternatively, HeLa cells were left untreated or treated with 50  $\mu$ M z-VAD-fmk for 15 min, and then either kept in control (Co) culture conditions or administered with 1  $\mu$ M MTX or 80 ng/ml rCXCL8 for additional 8 h (**e**). Subsequently, cells were processed for the flow cytometry-assisted detection of surface-exposed CRT. Quantitative data on the percentage of live (excluding PI, PI<sup>+</sup>) cells exposing CRT on their surface (means  $\pm$  S.E.M.;  $n = 3$ ;  $^{**}P < 0.01$ , NS = non significant, as compared with untreated cells;  $^{##}P < 0.01$ , as compared with cells receiving MTX or rCXCL8 only) are reported. (**f**) HeLa cells were transfected with either a control siRNA (UNR) or with siRNAs targeting the indicated proteins for 48 h, and then left untreated or administered with 80 ng/ml rCXCL8 for 8 h. Finally, CRT exposure was assessed by surface immunostaining and flow cytometry. Quantitative data on the percentage of live (excluding PI, PI<sup>+</sup>) cells exposing CRT on their surface (means  $\pm$  S.E.M.;  $n = 2$ ;  $^{**}P < 0.01$ , as compared with untreated UNR-transfected cells;  $^{#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ , as compared with equally treated UNR-transfected cells) are reported

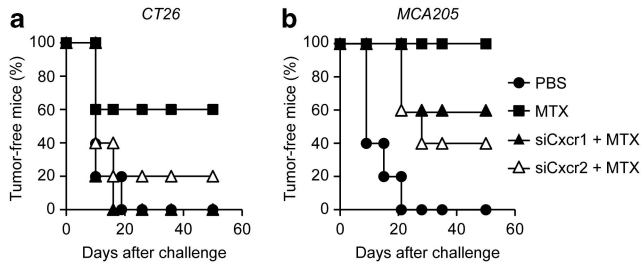
When a haploid *S. cerevisiae* cell is ready to mate, it secretes pheromones that signal cells of the opposite mating type to stop proliferating and prepare for sexual reproduction. The fusion of two haploid cells of opposite mating types generates a diploid cell that subsequently undergoes meiosis, generating haploid cells with new genetic assortments.<sup>38</sup> Here, we report that yeast pheromones can stimulate the relocalization of the CRT ortholog Cne1p to the cell periphery, and that Cne1p is required for optimal mating, in particular in shaking cultures (in which stable intercellular contacts are rather difficult to be achieved). Our results indicate that Cne1p is not absolutely required for mating but facilitates cell-to-cell conjugation, in line with previous observations on the role of surface-exposed CRT in the fertilization of oocytes by sperm cells.<sup>21–24</sup> These findings point to the existence of phylogenetically conserved mechanisms for sexual reproduction and suggest that common factors (such as CRT and polyamines) may have similar roles in improving fertility across phyla.<sup>39</sup>

Translating our findings from yeast to the mammalian system, we discovered that a series of soluble factors acting on GPCRs (which structurally resemble the yeast pheromone receptor) facilitate the immunogenic exposure of CRT. Thus, several chemokines including human CXCL8 and its mouse ortholog Cxcl2 are endowed with the ability to stimulate CRT exposure in cancer cells by acting on the receptors CXCR1/Cxcr1 and CXCR2/Cxcr2. As the mammalian genome encodes several hundred GPCRs,<sup>40</sup> we suspect that other ligands and receptors of the same class may be involved in this process. Future studies should explore this possibility in a systematic manner.

CXCL8 and other chemokines are often produced by cancer cells in a constitutive manner, acting as autocrine/paracrine growth factors and stimulating local inflammatory and immune responses. These mediators operate in a strictly context-dependent manner, meaning that their relationship to oncogenesis, cell-autonomous oncosuppression (by senescence or apoptosis), tumor progression, the epithelial–mesenchymal transition and immunosurveillance is highly complex.<sup>41,42</sup> For instance, an elevated production of CXCL8 characterizes the so-called ‘senescence-associated secretory phenotype’, meaning that senescent tumor cells or tumor-associated fibroblasts can generate an extracellular microenvironment rich in CXCL8.<sup>43</sup> In addition, breast cancer cells reportedly can escape from the therapeutic inhibition of the phosphoinositide-3-kinase/mammalian target of rapamycin (PI3K/mTOR) signaling cascade by upregulating CXCL8 and hence activating alternative growth-stimulatory pathways.<sup>44</sup> Of note, high expression levels of CXCL8 or CXCR2 have been associated with worsened disease outcome in several types of cancer, including astrocytomas and lung adenocarcinoma.<sup>45,46</sup>

Thus, it may appear paradoxical that the CXCL8/CXCR1-2 system is often constitutively active in cancer cells, mainly mediating pro-tumorigenic effects, yet can be hyperactivated by immunogenic chemotherapy to promote CRT exposure and ICD. Previous studies have shown that radiotherapy can also stimulate CXCL8 production,<sup>47</sup> in line with the fact that both  $\gamma$  and UV rays induce CRT-dependent ICD.<sup>5,11</sup> Local radiotherapy can indeed mediate so-called ‘abscopal’ effects. These consist in the regression of distant non-irradiated





**Figure 4** Impact of CXCL8 on anticancer immune responses elicited *in vivo* by ICD. (a and b) Immunocompetent BALB/c ( $n = 10$  per group) or C57Bl/6 ( $n = 5$  per group) mice were inoculated s.c. with CT26 or MCA205 cells, respectively, which had previously been left untransfected or transfected with siRNAs targeting Cxcr1 or Cxcr2 for 48 h and then treated with 2  $\mu$ M MTX for 20 h. PBS was used as a negative control condition. Seven days later, all mice were re-challenged with live CT26 or MCA205 cells and tumor incidence was routinely monitored. Kaplan–Meier curves depict the percentage of tumor-free mice over time

lesions or metastases, presumably reflecting a systemic anticancer immune response that results from the immunogenic death of malignant cells belonging to the (irradiated) primary tumor mass.<sup>48</sup> Nevertheless, the putative functional implication of CXCL8 in the abscopal effects of radiotherapy needs to be investigated in more detail.

The first immunotherapeutic anticancer regimen to be introduced into the clinical routine was based on the intravesical instillation of the bacillus Calmette–Guérin (BCG), a live attenuated form of *Mycobacterium bovis*, shortly after the transurethral resection of superficial urothelial carcinoma.<sup>49,50</sup> This treatment is particularly efficient when pre-existing BCG-specific T cells are primed for interferon  $\gamma$  production, presumably within residual tumor lesions or draining lymph nodes.<sup>51</sup> In this context, the urinary concentration of CXCL8 has turned out to constitute an early biomarker of subsequent immune responses and to predict therapeutic outcome.<sup>52</sup> BCG induces the apoptotic death of bladder cancer cells either directly or through the activation of humoral or cellular immune effectors,<sup>53</sup> suggesting that, by promoting ICD, CXCL8 might have a decisive role in the therapeutic efficacy of BCG-based immunotherapy.

In conclusion, our work unravels an unsuspected contribution of chemokines to CRT exposure and ICD as elicited by immunogenic chemotherapeutics. We surmise that this finding may have major implications for the comprehension of anticancer immune responses as well as for their therapeutic modulation.

## Materials and Methods

**Chemicals and cell cultures.** Unless otherwise noted, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), cell culture media and supplements from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) and plasticware from Corning Life Sciences (Corning, NY, USA). Human cervical carcinoma HeLa cells, human osteosarcoma U2OS cells and their derivatives were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin G sodium and 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate. Human colon carcinoma HCT 116 cells were maintained in McCoy's 5A medium supplemented as above. Murine fibrosarcoma MCA205 and murine colon carcinoma CT26 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented as above. Mouse embryonic fibroblasts were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, non-essential amino acids, 100 units/ml penicillin G sodium and 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate. HeLa cells engineered for the stable expression of a

GFP-LC3 chimera were maintained in the presence of 200  $\mu$ g/ml geneticin while U2OS cells stably co-expressing a histone 2B-red fluorescent protein (H2B-RFP) fusion and a CRT-GFP chimera<sup>13</sup> were cultured in the continuous presence of 200  $\mu$ g/ml zeocine plus 1  $\mu$ g/ml blasticidine. Z-VAD-fmk was obtained from Bachem (Basel, Switzerland), whereas rCXCL8, rCCL2 and rCcl2 were purchased from (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

**Yeast strains.** The haploid WT *Saccharomyces cerevisiae* strains BY4741 (MAT $\alpha$ ; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 10*; *met15 $\Delta$ 10*; *ura3 $\Delta$ 10*) and BY4742 (MAT $\alpha$ ; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 10*; *lys2 $\Delta$ 10*; *ura3 $\Delta$ 10*), as well as the  $\Delta$ *cne1* and  $\Delta$ *ura1* BY4741 mutants used in this study were obtained from Euroscarf (Frankfurt, Germany). The  $\Delta$ *mfa1*/*mfa2* strain was generated by deleting *mfa2* in  $\Delta$ *mfa1* BY4741 cells, followed by the GFP tagging of *cne1* via standard procedures.<sup>54</sup> The  $\Delta$ *gcn2*,  $\Delta$ *yet3* and  $\Delta$ *ire1* BY4741 strains used for Cne1-GFP translocation studies have previously been described.<sup>25</sup>

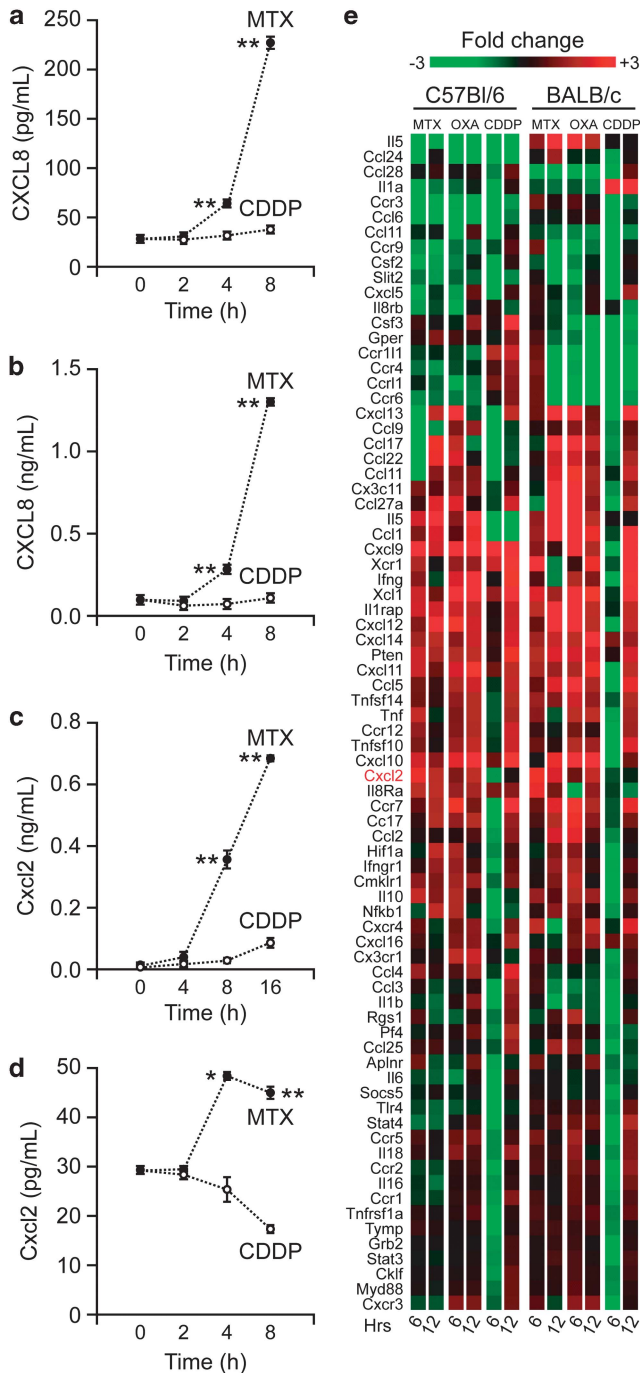
**Yeast culture.** For the evaluation of mating efficiency, yeast strains were grown (at 28 °C) on yeast extract peptone dextrose (YEPD) medium containing 1% yeast extract, 2% peptone and 2% D-glucose and processed as described below. For Cne1-GFP translocation studies, yeast strains were cultured (at 28 °C) in synthetic complete (SC) medium containing 0.17% yeast nitrogen base (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30 mg/l amino acids but histidine (80 mg/l) and leucine (200 mg/l), 30 mg/l adenine, 320 mg/l uracil and 2% glucose (as carbon source). Two percent agar was added to obtain solid media.

**Microscopic evaluation of Cne1-GFP relocalization.** Exponentially growing yeast cultures were split into aliquots and treated with 10  $\mu$ M MTX or 100  $\mu$ M  $\alpha$  factor for 4 h. Thereafter, the intracellular localization of Cne1-GFP was analyzed by means of an Axioskop fluorescence microscope (Zeiss, Wetzlar, Germany) equipped with an eGFP-specific bandpass filter.

**Yeast mating efficiency.** To determine mating efficiency,  $1 \times 10^7$  BY4742 (MAT $\alpha$ ) cells were mixed with  $2 \times 10^6$  WT BY4741 (MAT $\alpha$ ),  $\Delta$ *cne1* BY4741 (MAT $\alpha$ ) or  $\Delta$ *ura1* BY4741 (MAT $\alpha$ ) cells in 20 ml YEPD medium. Cultures were agitated for 3 h and aliquots were seeded on agar plates containing different media. Thus, (i) the amount of viable haploid BY4741 and diploid cells was assessed by plating 500 cells from co-cultures on SC agar plates containing all amino acids except lysine, and (ii) the amount of viable diploid cells was determined by plating 2000 cells from co-cultures on SC agar plates containing all amino acids except lysine and methionine. After incubation for 2 days at 28 °C, colony-forming units (CFUs) were enumerated and mating efficiency was determined as the ratio between diploid and diploid plus haploid BY4741 MAT $\alpha$  CFUs.

**RNA interference.** RNA interference experiments were performed by transfecting cells with a non-targeting control siRNA (herein referred to as UNR, sense 5'-GCCGGUUAUGCCGGUUAAGUdTdT-3'), with siRNAs specific for BAK1 (sense 5'-GCCAAGUCUUUGCCUUCUCdTdT-3'), BAX (sense 5'-GGGUUUCAUCCAGGAUCGAdTdT-3'), BECN1 (sense 5'-CUCAGGAGAGGAGCCAUUdTdT-3'), BCAP31 (sense 5'-GCGCGAAAUUCGGAAGUdTdT-3'), CASP8 (sense 5'-CAUCUCAGUUCACUGGUUdTdT-3'), CRT (sense 5'-CCGCGUGGUGCAUCCAAAdTdT-3'), CCL2 (sense 5'-GCAGAAGUGGUUCAGGAUdTdT-3'), CCL5 (sense 5'-GGUUCGGGAGUACAUAACdTdT-3'), CCR2 (sense 5'-GUAAUGAUGUCGUUUGAAUdTdT-3'), CCR5 (sense 5'-GUCAGUAUCAAUUCUGGAAdTdT-3'), CXCL8 (sense 5'-GCGCCAACACAGAAUUAUdTdT-3'), CXCL12 (sense 5'-CCAUGUAGAAGCCACUUAUdTdT-3'), CXCR1 (sense 5'-GCGUCAUUGGUCAAGUUUdTdT-3'), CXCR4 (sense 5'-GGAAGCUGUUGGCUGAAAdTdT-3'), eIF2 $\alpha$  (sense 5'-GAAACUGAAGCAUUGCAAdTdT-3'), PERK (sense 5'-CUCACAGGCAAAGGAAGGAdTdT-3'), SNAP25 (sense 5'-CAGGC AUUGCACUAAAAGUdTdT-3') or VAMP1 (sense 5'-GGACAUCAGCGUGUGAAUdTdT-3'), all obtained from Sigma-Aldrich; or with commercial siRNA pools targeting Cxcr1 or Cxcr2 (Dharmacon, Waltham, MA, USA). siRNAs were transfected by means of the HiPerfect transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany), as previously described.<sup>55,56</sup>

**siRNA array screening.** Bio-one  $\mu$ Clear 384-well plates (Greiner Bio One, Kremsmünster, Austria) were printed with 3.125 ng individual siRNAs (Qiagen) designed to target 250 different human proteins implicated in cell death and stress-response pathways. siRNA positioning was randomized to minimize spatial



**Figure 5** Release and transcriptional regulation of CXCL8 and Cxcl2 in the course of ICD. (a–d) Human cervical carcinoma HeLa cells (a), human colorectal carcinoma HCT 116 cells (b), murine fibrosarcoma MCA205 cells (c) and mouse embryonic fibroblasts (d) were treated with 75 (a, b and d) or 150 (c)  $\mu$ M cisplatin (CDDP) or with 2 (a, b and d) or 4 (c)  $\mu$ M MTX for the indicated time, followed by the analysis of culture supernatants for CXCL8 (a and b) and Cxcl2 (c and d) levels. Quantitative data (means  $\pm$  S.E.M.;  $n=3$ ; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , as compared with CDDP-treated cells) are reported. (e) Immunocompetent BALB/c or C57Bl/6 mice bearing established CT26 colon carcinomas and MCA205 fibrosarcomas, respectively, were treated with 5.17 mg/kg MTX, 10 mg/kg oxaliplatin (OXA) or 0.25 mg/kg cisplatin (CDDP) for 6 or 12 h, followed by the recovery of tumors and their processing for quantitative RT-PCR analyses. Average fold changes as determined on  $n=3$  independent experiments are depicted

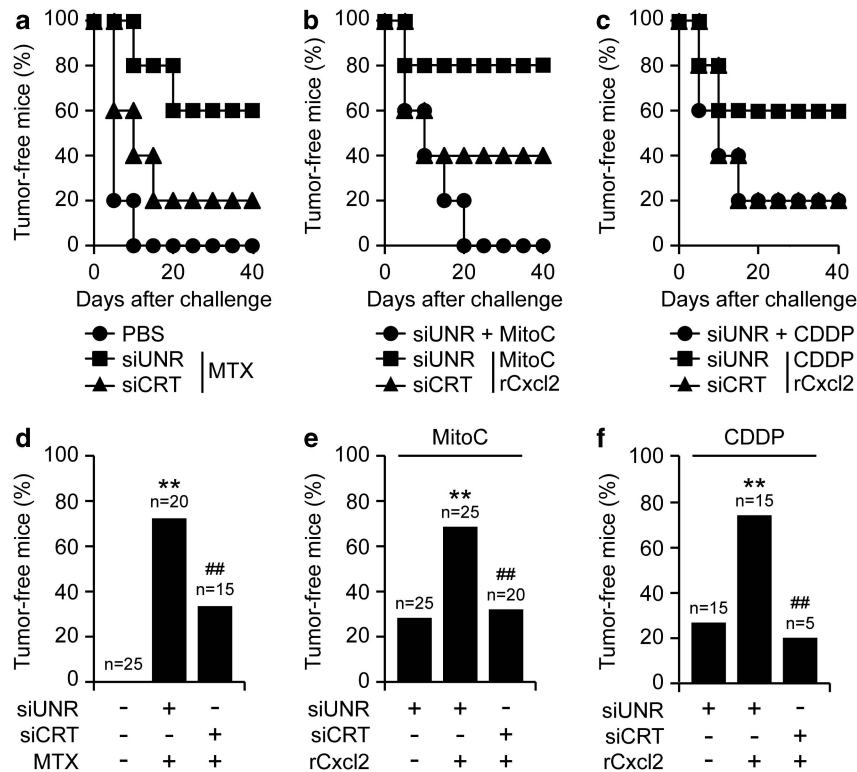
effects. For each gene, two distinct siRNAs were chosen, favoring experimentally verified siRNAs that were identified on the GeneGlobe Search Center (Qiagen). After printing, plates were dehydrated, sealed and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until usage. Reverse transfection was performed by means of the HiPerfect Transfection Reagent on re-hydration of siRNAs with 5  $\mu$ l OptiMEM (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. In this setting,  $2 \times 10^3$  U2OS cells stably co-expressing H2B-RFP and CRT-GFP were seeded in each well and maintained for 48 h before the administration of 1  $\mu$ M MTX for additional 4 h. Eventually, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (w/v in PBS) for 20 min at room temperature, washed and stored in PBS at  $4^{\circ}\text{C}$  until imaging. Four view fields per well were acquired by means of a BD Pathway 855 automated bioimager (BD Biosciences) equipped with a UAp0/340 20X/0.75 objective (Olympus, Center Valley, PA, USA). Subsequently, images were segmented and analyzed for GFP granularity by using the AttoVision software v. 1.7 (BD Biosciences). Finally, data were mined and statistically evaluated using the Prism software v. 5 (Graph Pad software Inc., La Jolla, CA, USA).

**Automated evaluation of autophagy.** Autophagy was monitored by automated fluorescence microscopy. To this aim,  $5 \times 10^3$  GFP-LC3-expressing HeLa cells were seeded in 96-well Black/Clear imaging plates (BD Biosciences) and allowed to adapt for 24 h. Thereafter, cells were treated with 40, 80, 160 or 320 ng/ml rCXCL8 or 1  $\mu$ M rapamycin for up to additional 24 h, fixed in 4% paraformaldehyde (w/v in PBS) supplemented with 1  $\mu$ M Hoechst 33342 (Life Technologies) for 20 min at room temperature, and processed for imaging as described above. Images were segmented and analyzed for the number of GFP<sup>+</sup> dots per cell by means of the AttoVision software v. 1.7.

**ATP release assay.** To quantify ATP release in the course of ICD, WT HeLa cells growing in 12- or 24-well plates were treated with 40, 80, 160 or 320 ng/ml rCXCL8 or 2  $\mu$ M MTX for 24 h, and then stained with 1  $\mu$ M quinacrine plus 1  $\mu$ g/ml propidium iodide (PI, Life Technologies) for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Thereafter, quinacrine fluorescence was monitored on a FACScan or FACScalibur cytofluorometer (BD Biosciences). First-line statistical analyses – limited to live (PI<sup>-</sup>) cells – were performed by means of the Cell Quest Software package (BD Biosciences). Alternatively, extracellular ATP levels were measured by the luciferin-based ENLITEN ATP Assay (Promega, Madison, WI, USA). In this setting, ATP-driven chemoluminescence was recorded on a FLUOstar OPTIMA FL Plate Reader (BMG Labtech, Offenbach, Germany).

**Determination of surface-exposed CRT.** CRT exposure was assessed by surface immunostaining and flow cytometry or fluorescence microscopy, as previously described.<sup>3,57</sup> In brief, cells growing on standard supports were collected, washed twice with PBS and fixed in 0.25% paraformaldehyde (w/v in PBS) for 5 min at RT. Alternatively, cells grown on coverslips were washed and similarly fixed. After two additional washes in cold PBS, cells were incubated with an anti-CRT antibody (ab2907, Abcam, Cambridge, UK) diluted in cold blocking buffer (2% FBS, v/v in PBS) for 30 min on ice, washed and incubated for additional 30 min with an anti-rabbit AlexaFluor 488 conjugate (Life Technologies) in blocking buffer. For fluorescence microscopy studies, 5  $\mu$ g/ml AlexaFluor 633-conjugated wheat germ agglutinin (Life Technologies) was added to visualize the plasma membrane. Finally, samples were washed in cold PBS, incubated with 1  $\mu$ g/ml PI for 5 min and either analyzed on a FACScan cytofluorometer or re-fixed in 3.7% paraformaldehyde plus 1  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Life Technologies), washed, embedded in Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) and analyzed by means of a TCS SPE confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), equipped with a 63X/1.15 objective (Olympus). For cytofluorometric analyses, isotype-matched IgG antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) were used as control conditions, and statistical analyses – limited to live (PI<sup>-</sup>) cells – were performed by means of the Cell Quest Software package.<sup>58,59</sup>

**Cell death assays.** Apoptotic cell death was quantified based on the exposure of phosphatidylserine on the cell surface and plasma membrane permeabilization.<sup>59,60</sup> To this aim, cells were collected and stained with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-tagged version of Annexin V plus PI by means of the FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Biosciences), as per the manufacturer's instructions. Cytofluorometric acquisitions were performed on a FACScan or FACScalibur cytofluorometer, and first-line statistical analyses were carried out on the Cell Quest Software package.



**Figure 6** ICD as induced by non-immunogenic chemotherapeutics plus Cxcl2. (a–f) Immunocompetent C57Bl/6 mice ( $n = 5$  per group) were inoculated s.c. with PBS or murine MCA205 fibrosarcoma cells that had previously been transfected with a control siRNA (siUNR) or with a siRNA targeting CRT (siCRT) and then treated with 2  $\mu$ M MTX, 200  $\mu$ M mitomycin C (MitoC), 150  $\mu$ M cisplatin (CDDP), alone or combined with 80 ng/ml rCxcl2, for 20 h. Panels (a–c) report Kaplan–Meier curves depicting the percentage of tumor-free mice over time. Panels (d–f) depict the percentage of tumor free animals at the end of the experiment. The numbers of mice allocated to each group is indicated. \*\* $P < 0.01$ , as compared with animals receiving PBS only (d), siUNR-transfected cells treated with MitoC (e) or siUNR-transfected cells treated with CDDP (f); ## $P < 0.01$ , as compared with animals receiving siUNR-transfected cells treated with MTX (d), MitoC plus rCxcl2 (e) or CDDP plus rCxcl2 (f)

**Immunoblotting.** For immunoblotting, approximately  $1 \times 10^6$  cells were washed with cold PBS and lysed as previously described.<sup>55,56</sup> Fifty micrograms of proteins were then separated according to molecular weight on NuPAGE Novex Bis-Tris 4–12% pre-cast gels (Life Technologies) and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Unspecific binding sites were blocked by incubating membranes for 1 h in 0.05% Tween 20 (v/v in TBS) supplemented with 5% non-fat powdered milk, followed by overnight incubation at 4 °C with primary antibodies specific for BECN1 (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or CASP8 (Calbiochem-Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Equal loading of lanes was monitored by probing membranes with antibodies specific for  $\beta$ -actin (Millipore-Chemicon International, Temecula, CA, USA). Primary antibodies were detected with appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (Southern Biotechnologies Associates, Birmingham, UK) and revealed on a ImageQuant LAS 4000 software-assisted imager on incubation with the ECL Plus Western Blotting Detection System (both from GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

**Quantification of extracellular CXCL8 and Cxcl2.** The concentration of CXCL8 and Cxcl2 in culture supernatants was measured by means of commercial ELISA kits (Biolegend, San Diego, CA, USA and R&D Systems), following the manufacturer's instructions. Absorbance was monitored by means of a FLUOstar Optima fluorescence plate reader (BMG Labtech).

**Transcriptomic studies.** BALB/c or C57Bl/6 mice were inoculated s.c. with  $5 \times 10^5$  CT26 cells or  $2 \times 10^5$  MCA205 cells, respectively. When tumor size reached 40–80 mm<sup>2</sup>, mice were treated i.p. with 10 mg/kg oxaliplatin, 0.25 mg/kg cisplatin or 5.17 mg/kg MTX. Whole RNA from tumor homogenates was extracted using the RNAqueous kit (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. Five micrograms RNA from each sample were then reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), as per the manufacturer's recommendations. Subsequently, gene

expression assays were performed using a Mouse Chemokine Gene Set v1.0 custom TaqMan Array Micro Fluidic Card (Life Technologies) and analyzed by means of an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies).

**Antitumor vaccination studies.** All animal experiments were approved by the local Ethics Committee (CEEA IRCIV/ IGR n°26, registered with the French Ministry of Research), were in compliance with the 63/2010/EU directive from the European Parliament and respected the FELASA guidelines. C57Bl/6 and BALB/c mice (Charles River Laboratory, Wilmington, MA, USA) were housed in a temperature-controlled environment with 12-h light–dark cycles and received food and water *ad libitum*. For vaccination experiments,  $3 \times 10^5$  MCA205 or  $3 \times 10^6$  CT26 cells dying in response to MTX, cisplatin or mitomycin C (alone or combined with rCXCL8) were inoculated s.c. into the flank of 6-week-old female C57Bl/6 or BALB/c mice, respectively. Seven days later, C57Bl/6 or BALB/c mice were re-challenged in the contralateral flank with  $1 \times 10^5$  living MCA205 cells or  $5 \times 10^5$  CT26 cells, respectively, and tumor incidence was routinely monitored for up to 50 days.

**Statistical procedures.** Unless otherwise indicated, assays were performed in triplicate instances, yielding comparable results. Data (generally are presented as means  $\pm$  S.D. or means  $\pm$  S.E.M.), were analyzed with Microsoft Excel (Microsoft Co., Redmont, WA, USA). Statistical significance was assessed by paired or unpaired (as appropriate), two-tailed Student's *t*-tests or Pearson's  $\chi^2$  test, as appropriate. *P*-values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.



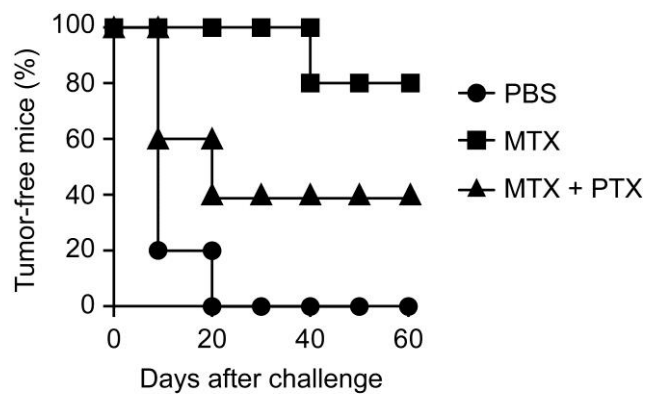
**Acknowledgements.** GK is supported by the European Commission (ArtForce); Agence Nationale de la Recherche (ANR); Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée); Fondation pour la Recherche Médicale (FRM); Institut National du Cancer (INCa); LabEx Immuno-Oncologie; Fondation de France; Fondation Bettencourt-Schueller; AXA Chair for Longevity Research; Cancéropôle Ile-de-France and Paris Alliance of Cancer Research Institutes (PACRI). AQS is supported by Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. IM is supported by la Ligue Nationale contre le Cancer. We thank SIRIC SOCRATE for their critical support. We are grateful to the Austrian Science Fund FWF (Austria) for grants P23490-B12 and P24381-B20 to FM.

- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 107–120.
- Beneteau M, Zunino B, Jacquin MA, Meynet O, Chiche J, Pradelli LA et al. Combination of glycolysis inhibition with chemotherapy results in an antitumor immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 20071–20076.
- Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011; **334**: 1573–1577.
- Yang Y, Li XJ, Chen Z, Zhu XX, Wang J, Zhang LB et al. Wogonin-induced calreticulin/annexin A1 exposure dictates the immunogenicity of cancer cells in a PERK/AKT-dependent manner. *PLoS One* 2012; **7**: e50811.
- Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 2013; **31**: 51–72.
- Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, Yamazaki T, Aymeric L, Yang H et al. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* 2013; **38**: 729–741.
- Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 105–113.
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 298–306.
- Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2012; **11**: 215–233.
- Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH et al. Trial watch: prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 1323–1343.
- Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 860–875.
- Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005; **202**: 1691–1701.
- Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* 2011; **30**: 1147–1158.
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; **13**: 54–61.
- Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005; **123**: 321–334.
- Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 2009; **28**: 578–590.
- Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* 2012; **31**: 1062–1079.
- Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, Martins I, Ma Y, Shen S et al. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Sci Transl Med* 2012; **4**: 143ra199.
- Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P, Agostinis P. The emergence of phox-ER stress induced immunogenic apoptosis. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 786–788.
- Raghavan M, Wijeyesakere SJ, Peters LR, Del Cid N. Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends Immunol* 2013; **34**: 13–21.
- Nakamura M, Moriya M, Baba T, Michikawa Y, Yamanobe T, Arai K et al. An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp Cell Res* 1993; **205**: 101–110.
- Tutuncu L, Stein P, Ord TS, Jorgez CJ, Williams CJ. Calreticulin on the mouse egg surface mediates transmembrane signaling linked to cell cycle resumption. *Dev Biol* 2004; **270**: 246–260.
- Nakamura M, Oshio S, Tamura A, Okinaga S, Arai K. Antisera to calreticulin inhibits sperm motility in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **186**: 984–990.
- Park BJ, Lee DG, Yu JR, Jung SK, Choi K, Lee J et al. Calreticulin, a calcium-binding molecular chaperone, is required for stress response and fertility in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 2835–2845.
- Madeo F, Durchschlag M, Kepp O, Panaretakis T, Zitvogel L, Frohlich KU et al. Phylogenetic conservation of the preapoptotic calreticulin exposure pathway from yeast to mammals. *Cell Cycle* 2009; **8**: 639–642.
- Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 2004; **172**: 3042–3050.
- Girard-Misguich F, Sachse M, Santi-Rocca J, Guillen N. The endoplasmic reticulum chaperone calreticulin is recruited to the uropod during capping of surface receptors in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 2008; **157**: 236–240.
- Vacchelli E, Galluzzi L, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, Tartour E et al. Trial watch: chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 179–188.
- Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 2011; **333**: 1891–1894.
- Cole GM, Reed SI. Pheromone-induced phosphorylation of a G protein beta subunit in *S. cerevisiae* is associated with an adaptive response to mating pheromone. *Cell* 1991; **64**: 703–716.
- Hildebrandt JD, Sekura RD, Codina J, Iyengar R, Manclark CR, Birnbaumer L. Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature* 1983; **302**: 706–709.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; **87**: 99–163.
- Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y et al. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2012; **72**: 2609–2621.
- Page C, Duret H, Ngiew SF, Kansara M, Thomas DM, Smyth MJ. Studying the role of the immune system on the antitumor activity of a Hedgehog inhibitor against murine osteosarcoma. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 1313–1322.
- Zappasodi R, Pupa SM, Ghedini GC, Bongarzone I, Magni M, Cabras AD et al. Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death. *Cancer Res* 2010; **70**: 9062–9072.
- Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med* 2010; **2**: 63ra84.
- Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J et al. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res* 2011; **71**: 4821–4833.
- Haber JE. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2012; **191**: 33–64.
- Bauer MA, Carmona-Gutierrez D, Ruckstuhl C, Reisenbichler A, Megalou EV, Eisenberg T et al. Spermidine promotes mating and fertilization efficiency in model organisms. *Cell Cycle* 2013; **12**: 346–352.
- Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2010; **9**: 373–386.
- Mishra P, Banerjee D, Ben-Baruch A. Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. *J Leukoc Biol* 2011; **89**: 31–39.
- Verbeke H, Struyf S, Laureys G, Van Damme J. The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; **22**: 345–358.
- Pazolli E, Alspach E, Milczarek A, Prior J, Piwnicka-Worms D, Stewart SA. Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res* 2012; **72**: 2251–2261.
- Britschgi A, Andraos R, Brinkhaus H, Klebba I, Romanet V, Muller U et al. JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer. *Cancer Cell* 2012; **22**: 796–811.
- Piperi C, Samaras V, Levidou G, Kavantzis N, Boviatis E, Petraki K et al. Prognostic significance of IL-8-STAT-3 pathway in astrocytomas: correlation with IL-6, VEGF and microvessel morphometry. *Cytokine* 2011; **55**: 387–395.
- Saintigny P, Massarelli E, Lin S, Ahn YH, Chen Y, Goswami S et al. CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2013; **73**: 571–582.
- Hei TK, Zhou H, Chai Y, Ponnaiya B, Ivanov VN. Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications. *Curr Mol Pharmacol* 2011; **4**: 96–105.
- Frey B, Rubner Y, Wunderlich R, Weiss EM, Pockley AG, Fietkau R et al. Induction of abscopal anti-tumor immunity and immunogenic tumor cell death by ionizing irradiation—implications for cancer therapies. *Curr Med Chem* 2012; **19**: 1751–1764.
- Galluzzi L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C et al. Trial watch: experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 699–716.
- Vacchelli E, Galluzzi L, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C et al. Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 894–907.

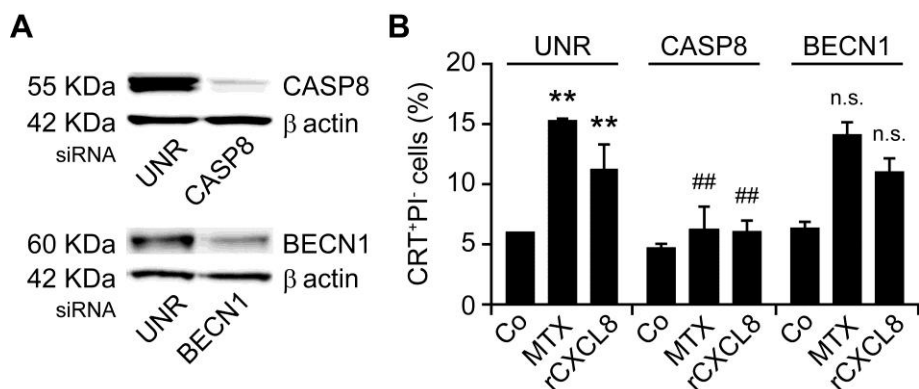
51. Biot C, Rentsch CA, Gsponer JR, Birkhauser FD, Jusforgues-Saklani H, Lemaitre F *et al*. Preexisting BCG-specific T cells improve intravesical immunotherapy for bladder cancer. *Sci Transl Med* 2012; **4**: 137ra172.
52. Thalmann GN, Sermier A, Rentsch C, Mohrle K, Cecchini MG, Studer UE. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 2000; **164**: 2129–2133.
53. DiPaola RS, Lattime EC. Bacillus Calmette-Guerin mechanism of action: the role of immunity, apoptosis, necrosis and autophagy. *J Urol* 2007; **178**: 1840–1841.
54. Sheff MA, Thorn KS. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2004; **21**: 661–670.
55. Galluzzi L, Morselli E, Vitale I, Kepp O, Senovilla L, Criollo A *et al*. miR-181a and miR-630 regulate cisplatin-induced cancer cell death. *Cancer Res* 2010; **70**: 1793–1803.
56. Galluzzi L, Vitale I, Senovilla L, Olaussen KA, Pinna G, Eisenberg T *et al*. Prognostic impact of vitamin B6 metabolism in lung cancer. *Cell Rep* 2012; **2**: 257–269.
57. Senovilla L, Vitale I, Martins I, Tailler M, Pailleret C, Michaud M *et al*. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science* 2012; **337**: 1678–1684.
58. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 1093–1107.
59. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011; **10**: 221–237.
60. Criollo A, Galluzzi L, Maiuri MC, Tasdemir E, Lavandro S, Kroemer G. Mitochondrial control of cell death induced by hyperosmotic stress. *Apoptosis* 2007; **12**: 3–18.

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

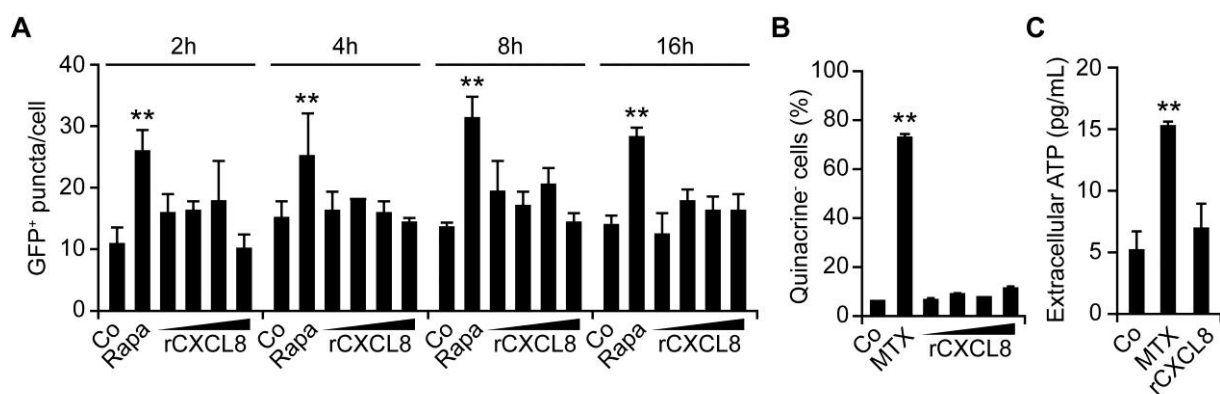




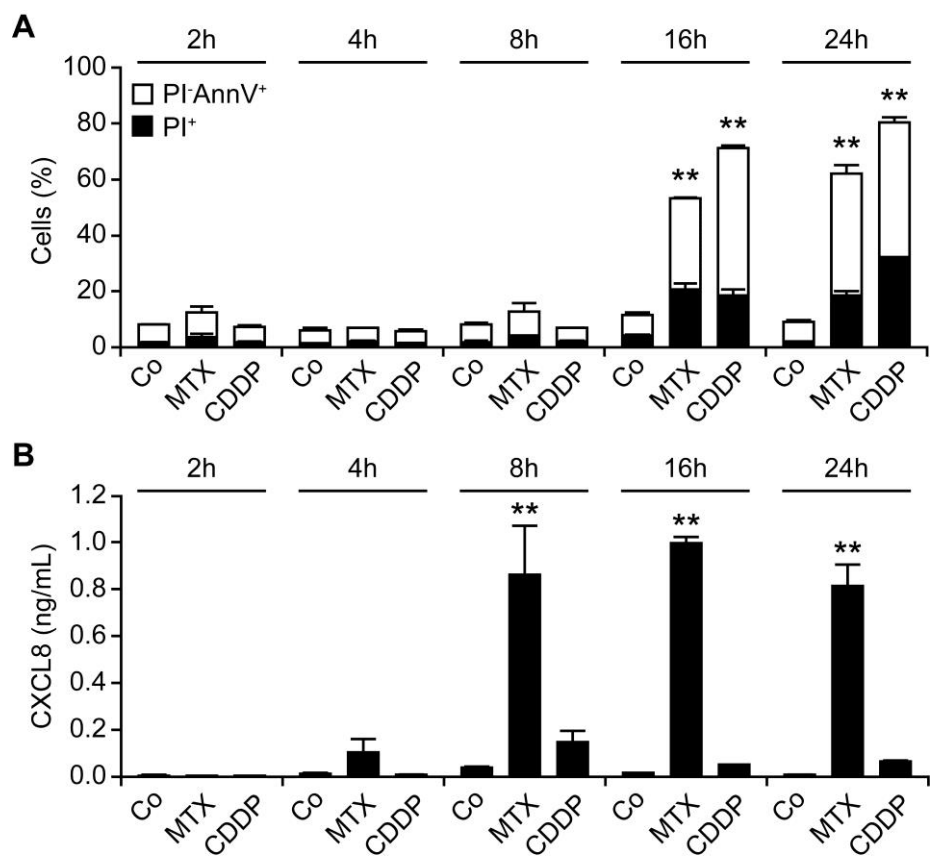
**Suppl. Figure S1**



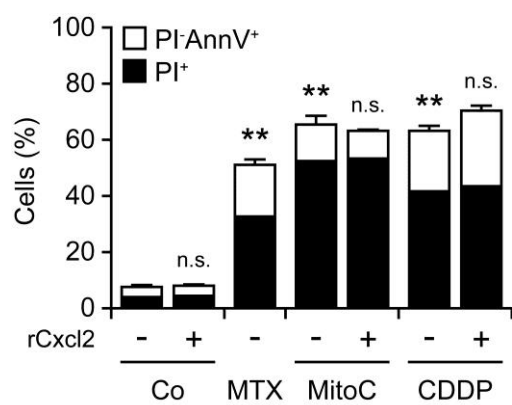
**Suppl. Figure S2**



**Suppl. Figure S3**



**Suppl. Figure S4**



**Suppl. Figure S5**

## Legends to Supplementary Figures

**Supplementary Figure S1. Contribution of chemokine signaling to immunogenic cell death.** Immunocompetent C57Bl/6 (n = 5 per group) mice were inoculated *s.c.* with MCA205 cells that had previously been treated with 2  $\mu$ M mitoxantrone (MTX), alone or in combination with 80 ng/mL pertussis toxin (PTX), for 20 hrs. PBS was employed as a negative control condition. One week later, all mice were re-challenged with live MCA205 cells and tumor incidence was routinely monitored. Kaplan-Meier curves depict the percentage of tumor-free mice over time.

**Supplementary Figure S2. Contribution of caspase-8 and autophagy to CXCL8-mediated calreticulin exposure.** Human cervical carcinoma HeLa cells were transfected with either a control siRNA (UNR) or with siRNAs specific for caspase-8 (CASP8) or Beclin 1 (BECN1) for 48 hrs, and then kept in control (Co) culture conditions or treated with 80 nM recombinant CXCL8 (rCXCL8) or 1  $\mu$ M mitoxantrone (MTX) for 24 hrs. Subsequently, cells were processed for the flow cytometry-assisted detection of surface-exposed calreticulin (CRT). Quantitative data on the percentage of live (excluding propidium iodide, PI) cells exposing CRT on their surface (means  $\pm$  SEM; n = 2; \*\* $p$  < 0.01, as compared to untreated UNR-transfected cells; ## $p$  < 0.01, n.s. = non significant, as compared to equally treated UNR-transfected cells) are reported.

**Supplementary Figure S3. Modulation of autophagy and ATP release by CXCL8.**

**A.** Human cervical carcinoma HeLa cells stably expressing a green fluorescent protein (GFP)-LC3 fusion protein were kept in control (Co) culture conditions or treated with 40, 80, 160 or 320 ng/mL recombinant CXCL8 (rCXCL8) or 1  $\mu$ M

rapamycin (Rapa) for the indicated time. Thereafter, cells were processed for the fluorescence microscopy-assisted quantification of cytoplasmic GFP<sup>+</sup> dots per cell. Data are reported as means  $\pm$  SEM (n = 2, with  $\geq 500$  cells per sample;  $**p < 0.01$ , as compared to untreated cells at the same time point). **B,C.** Wild-type HeLa cells were kept in Co conditions or exposed to 2  $\mu$ M mitoxantrone (MTX) (**B,C**), 20, 40, 80 or 160 ng/mL recombinant CXCL8 (rCXCL8) (**B**) or 80 ng/mL rCXCL8 (**C**) for 24 hrs. Thereafter, either cells were stained with quinacrine and processed for the cytofluorometric quantification of ATP content (**B**), or extracellular ATP levels were assessed in culture supernatants by means of a commercial luciferase-based kit (**C**). Quantitative data on the percentage of ATP-depleted (quinacrine<sup>-</sup>) cells (means  $\pm$  SEM; n = 2;  $**p < 0.01$ , as compared to untreated cells) and on extracellular ATP levels (means  $\pm$  SEM;  $**p < 0.01$ , n.s. = non significant, as compared to untreated cells) are reported in **B** and **C**, respectively.

**Supplementary Figure S4. Kinetics of CXCL8 release in the course of immunogenic cell death.** Human cervical carcinoma HeLa cells were maintained in control (Co) culture conditions or treated with 2  $\mu$ M mitoxantrone (MTX) or 150  $\mu$ M cisplatin (CDDP) for the indicated time. Thereafter, either cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-tagged Annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI) for the cytofluorometric assessment of apoptosis-associated parameters (**A**), or culture supernatants were assessed for CXCL8 levels by means of a commercial ELISA kit (**B**). In panel **A**, white and black columns report the percentage of dying (PI AnnV<sup>+</sup>) and dead (PI<sup>+</sup>) cells, respectively. Data are reported as means  $\pm$  SEM (n = 2;  $**p < 0.01$ , as compared to untreated cells at the same time point).

**Supplementary Figure S5. Cell death induction by immunogenic and non-**

**immunogenic chemotherapeutics alone or combined with recombinant Cxcl2.**

Murine MCA205 fibrosarcoma cells were left untreated (Co) or treated with 2  $\mu$ M mitoxantrone (MTX), 200  $\mu$ M mitomycin C (MitoC), 150  $\mu$ M cisplatin (CDDP), alone or in combination with 80 ng/mL recombinant Cxcl2 (rCxcl2), for 20 hrs, and then stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-tagged Annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI) for the cytofluorometric assessment of apoptosis-associated parameters. White and black columns report the percentage of dying (PIAnnV<sup>+</sup>) and dead (PI<sup>+</sup>) cells, respectively. Data are reported as means  $\pm$  SEM; n = 3; \*\* $p$  < 0.01, as compared to untreated cells, n.s. = non significant, as compared to equally treated cells not receiving rCxcl2.

## Conclusion et Discussion

### 1) Mécanismes de libération d'ATP

Les résultats observés montrent une complexité inattendue dans les mécanismes qui régulent la sécrétion d'ATP par les cellules cancéreuses mourantes qui vont induire une immunité anti-tumorale.

Nos résultats confirment le modèle selon lequel le clivage de la PANX1 est requis pour l'activation de ce dernier (Qu, Misaghi et al. 2011, Sandilos, Chiu et al. 2012).

Cependant, nous avons pu observer de façon étonnante qu'un traitement des cellules par l'inhibiteur de caspases à large spectre Z-VAD-fmk, ne réduit pas seulement l'activité de PANX1, mais modifie également sa localisation sub-cellulaire. En effet, nous avons noté une augmentation significative de la quantité d'immunofluorescence de PANX1 détectable à la surface des cellules traitées par un inducteur de la mort cellulaire immunogène. Cet effet est strictement dépendant des caspases. Nous avons également pu noter qu'une inhibition d'ATG5 ou ATG7, et donc de l'autophagie, inhibe de façon significative la libération d'ATP associée normalement à la mort immunogénique, mais n'influence en aucun cas l'exposition à la surface cellulaire et l'activation de la PANX1. Nous avons utilisé deux modèles bien distincts, à savoir une activation de la PANX1 caspase-dépendante suite à un traitement par les anthracyclines ou l'oxaliplatine, et une expression inducible via la transfection d'un variant artificiel constitutivement actif de la PANX1 (tPANX1), mimant de ce fait l'activation faite par les caspases. Cependant, dans ces deux modèles, une inhibition de l'autophagie ne présente aucun impact sur la perméabilité de la membrane plasmique, visualisée avec le fluorophore de faible poids moléculaire, le YO-PRO-1.

Il est communément admis que l'ATP est librement distribué dans le cytosol à une concentration allant de 1 à 10 mM et que l'ouverture des canaux transmembranaires permet la libération passive de l'ATP dans le milieu extra-cellulaire (Ainscow, Mirshamsi et al. 2002, Li, Banerjee et al. 2011). Cependant, nos résultats prouvent le contraire : en effet, que ce soit dans la voie induite par l'activation des caspases ou dans le modèle artificiel faisant intervenir la forme tronquée de la PANX1, nous avons une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique au YO-PRO-1, aussi bien

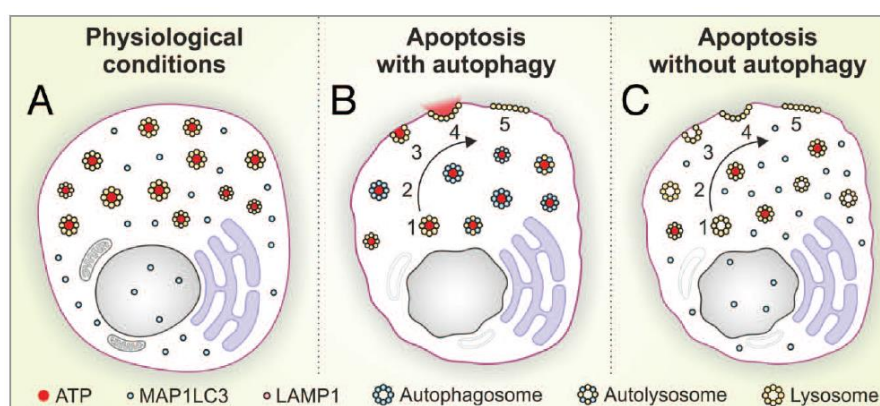
dans les cellules WT que dans les cellules déficientes pour l'autophagie, suggérant que la libération de l'ATP dans le milieu extracellulaire se fait de façon active. Comme la quantité d'ATP intracellulaire n'est pas réduite dans les cellules déficientes pour l'autophagie, que ce soit dans les conditions physiologiques ou encore après chimiothérapie immunogénique (Michaud, Martins et al. 2011), cela suggère que la seule ouverture des canaux PANX1 n'est pas suffisante pour la libération optimale d'ATP après traitement par les inducteurs de mort cellulaire immunogène.

Dans l'optique de cette hypothèse, nous avons trouvé une fraction d'ATP intracellulaire localisée dans des vésicules cytoplasmiques plutôt que dans le cytosol, ce qui expliquerait pourquoi il ne peut être diffusé librement à travers les canaux PANX1 une fois ces derniers activés. Ces vésicules contenant l'ATP ont été marquées positivement par le marqueur des lysosomes et par l'anticorps anti-LAMP1, surtout dans les conditions physiologiques, ce qui a été déjà observé dans plusieurs lignées cellulaires différentes (Zhang, Chen et al. 2007, Gonzales, Julien et al. 2010). En réponse à la chimiothérapie, la moitié des vésicules cytoplasmiques contenant de l'ATP reste positives pour le LAMP1, bien que la majorité d'entre elles deviennent positives pour le LC3-RFP, signifiant que l'ATP a été relocalisée dans les autophagosomes et les autolysosomes.

La déplétion de LAMP1, mais également de VAMP1 et de VAMP7, qui sont des récepteur lysosomaux de la famille des SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor) inhibe la libération d'ATP normalement observée dans le cas d'une mort cellulaire immunogène *in vitro* (Fader, Aguilera et al. 2012). Cela suggère donc l'idée que l'exocytose des lysosomes est primordiale dans cette voie. Des expériences *in vitro* ont montré une exposition de LAMP1 à la surface cellulaire après chimiothérapie immunogène, se dirigeant donc vers l'hypothèse d'une fusion des lysosomes avec la membrane plasmique durant l'apoptose (Franz, Herrmann et al. 2007). D'autre part, la déplétion des facteurs essentiels à l'autophagie, à savoir ATG5, ATG7 et BCN1, n'a pas d'impact sur la translocation de LAMP1 à la surface cellulaire, prouvant ainsi que l'autophagie n'intervient pas dans l'exocytose lysosomale. Contrairement à la déplétion de PANX1, qui inhibe la translocation de LAMP1 à la membrane plasmique, et *vice versa*, la déplétion de LAMP1 empêche l'externalisation de PANX1. De plus, PANX1 et LAMP1 sont tous deux incapables de transloquer à la surface cellulaire en présence de Z-VAD-fmk. Ces résultats montrent que l'exocytose lysosomale

est essentielle pour la libération d'ATP dans le cas d'une mort cellulaire immunogène, et de plus, PANX1 joue un rôle essentiel dans cette voie, mais dont les mécanismes d'action restent encore à être déterminés.

Nous avons également pu observer qu'une inhibition ou déplétion de ROCK1 et de la myosine II diminue le relargage d'ATP par les cellules exposées aux inducteurs de mort cellulaire immunogènes. Ainsi, le bourgeonnement apoptotique de la membrane plasmique semble être requis pour la sécrétion d'ATP, mais ce mécanisme de libération n'est pas relié aux autres voies de relargage. En effet, les inhibiteurs du bourgeonnement membranaires n'ont aucun effet sur la translocation et l'activation de la PANX1, sur l'autophagie et sur l'exocytose lysosomale. De même, les inhibiteurs de la PANX1, de l'autophagie et de l'exocytose lysosomale n'affectent pas le bourgeonnement membranaire. Une question importante reste cependant sans réponse, celle de savoir quelle est la contribution de l'autophagie dans la libération d'ATP. En effet, bien que la suppression de l'autophagie n'affecte pas le fonctionnement des canaux PANX1 et de la relocalisation de LAMP1 à la surface cellulaire, l'ATP est *in fine* relocalisé dans les autophago(lyso)somes après chimiothérapie immunogène dans nos expériences *in vitro*. Une des possibilités serait que la voie de relocalisation de l'ATP dépendante de l'autophagie favoriserait le transport des vésicules contenant l'ATP à la périphérie cellulaire, mais ne serait pas impliquée dans l'exocytose des vésicules LAMP1<sup>+</sup> ne contenant pas d'ATP (**Fig. 19**).



**Fig. 19 Représentation schématique de la libération d'ATP lors d'une mort cellulaire immunogénique.** A) l'ATP intracellulaire est localisé dans les lysosomes en conditions physiologiques. B) Au cours d'une mort immunogénique, les lysosomes contenant l'ATP fusionnent avec les autophagosomes et migrent à la surface cellulaire pour libérer l'ATP par exocytose. Ceci est accompagné de l'exposition de la protéine LAMP1. C) dans le cas de cellules déficientes en autophagie, le « pool » d'ATP n'est pas conservé au sein des lysosomes. Cependant, les lysosomes migrent tout de même à la surface cellulaire, exposant ainsi la protéine LAMP1 (Wang, Martins et al. 2013).



Nos résultats ont donc permis de mettre en évidence la complexité des voies de libération d'ATP après une chimiothérapie immunogène, impliquant des molécules essentielles pour différents processus, tel que ATG5, ATG7 et BCN1 pour l'autophagie, LAMP1 et VAMP1 pour l'exocytose des lysosomes, les caspases pour l'apoptose, ROCK1 et la myosine II pour le bourgeonnement membranaire et la PANX1 pour la perméabilisation de la membrane plasmique. Une déficience moléculaire dans n'importe laquelle de ces voies suffit pour abolir la libération d'ATP après traitement par les anthracyclines ou l'oxaliplatine, ce qui suggère qu'une altération dans une de ces voies pourrait être à l'origine d'une résistance aux chimiothérapies.

En perspective de ce travail, il serait intéressant d'étudier la relation qui peut exister entre la translocation de LAMP1 à la surface cellulaire et l'externalisation de PANX1. En effet, cette relation n'est pour l'instant pas encore décrite dans la bibliographie et nous ne connaissons pas les mécanismes qui pourraient les relier.

Pour cela, nous prévoyons de transfecter plusieurs lignées cellulaires avec différentes formes de PANX1, constitutivement active, la forme totale comprenant la partie C-terminale inhibitrice ou alors juste avec la partie C-terminale, et d'étudier leur impact sur la translocation de LAMP1 à la surface cellulaire par microscopie confocale et par microscopie automatisée ainsi que par cytométrie en flux. En parallèle de ce travail, nous étudierons également les conséquences sur la libération d'ATP après transfection des cellules par des expériences de cytométrie en flux. Nous étudierons également s'il y a une interaction directe entre LAMP1 et PANX1 qui permettrait la translocation à la surface cellulaire des vésicules contenant l'ATP grâce à des expériences de co-immunoprécipitation et de microscopie confocale. D'autre part, nous allons également étudier les conséquences des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de la PANX1 sur l'exposition à la surface cellulaire de LAMP1 par des expériences de cytométrie en flux.

Cependant, l'implication de l'ATP dans le succès de la chimiothérapie reste à être éclaircie. Il a en effet été montré que l'ATP extracellulaire pouvait être déphosphorylé en ADP et en AMP par CD39, puis hydrolysé en adénosine par CD73. Or l'adénosine peut aller se fixer sur ses récepteurs présents sur les cellules du système immunitaire, tels que le récepteur A2A qui est surexprimé par les macrophages après activation de ces dernières par les TLRs. Une fois le récepteur A2A activé, les macrophages vont passer d'un phénotype M1 à un phénotype M2, amenant ainsi à une production de VEGF

(Vascular Endothelial Growth Factor) et d'IL-10, deux cytokines facilitant la croissance tumorale (Grinberg, Hasko et al. 2009). L'adénosine peut également se fixer sur les récepteurs présents sur les NK, interférant avec leur capacité à produire le TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  (Miller, Cervenka et al. 1999). De plus, les voies de la perforine et Fas/FasL sont également inhibées par l'adénosine, limitant ainsi les capacités de lyse des cellules tumorales par les NK (Raskovalova, Huang et al. 2005). L'adénosine a aussi un impact sur la différenciation des DCs : contrairement aux DCs myéloïdes normales, celles-ci vont exprimer un haut niveau de facteurs angiogéniques, pro-inflammatoires, tolérogéniques tels que VEGF, IL-8, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  (Novitskiy, Ryzhov et al. 2008, Ghiringhelli, Bruchard et al. 2012).

Dans des travaux publiés en 2013, Bruchard et *al.*, ont montré que Gem et 5FU, deux molécules utilisées en chimiothérapie pour leur capacité à tuer sélectivement les MDSCs, étaient également capables d'induire une perméabilisation des lysosomes, amenant à la libération de la cathepsin B. L'inflammasome NLRP3 y est alors activée, conduisant à la production d'IL-1 $\beta$  (Ghiringhelli, Apetoh et al. 2009). Or une inflammation chronique est reconnue comme étant un évènement important dans la carcinogénèse et la progression tumorale (Apte and Voronov 2008, Carmi, Rinott et al. 2011). La sur-activation chronique d'IL-1 $\beta$  est considérée comme une condition favorisant la croissance tumorale par sa capacité à induire l'expansion des MDSC (Bunt, Yang et al. 2007). Dans des modèles *in vivo*, il a été montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 diminuait l'immunité anti-tumorale dans des expériences de vaccination, soutenant ainsi l'idée de l'effet délétère de NLRP3 dans le contexte du cancer (van Deventer, Burgents et al. 2010). IL-1 $\beta$  intervient également dans la génération et l'expansion des cellules Th17, qui peuvent induire des signaux de croissance tumorales (Wang, Yi et al. 2009).

Ces résultats sont donc en contradiction avec nos travaux, dans lesquels la libération d'ATP est absolument requise pour obtenir une mort cellulaire immunogène, au même titre que l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire et la libération de HMGB1. Nous avons également montré au préalable que la production d'IL-1 $\beta$  était essentielle pour l'apprêtement des cellules T CD8<sup>+</sup>, suggérant qu'une inflammation aigue lors de la chimiothérapie était bénéfique pour la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Ghiringhelli, Apetoh et al. 2009). Ces divergences dans les résultats peuvent être expliquées tout d'abord par le fait que les drogues 5FU et Gem n'induisent pas de mort cellulaire immunogénique, et de ce fait, il n'y a pas de reconnaissance croisée des

antigènes tumoraux par les cellules dendritiques ni d'activation des LT CD8<sup>+</sup>. D'autre part, l'ambiguïté des rôles joués par IL-1 $\beta$  peut être expliquée par sa concentration. En effet, si une faible concentration en IL-1 $\beta$  suffit pour induire la production d'IL-17 par les cellules T, seules de fortes concentrations en IL-1 $\beta$  conduisent à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> (Bruchard, Mignot et al. 2013).

## **2) Implication de CXCL8 comme inducteur d'exposition de la CRT**

L'exposition pré-apoptotique de la CRT à la surface cellulaire est apparue comme étant un marqueur essentiel de la mort cellulaire immunogène, suggérant qu'il pourrait prédire, du moins en partie, la capacité des cellules mourantes à induire une protection immunitaire anti-cancéreuse (Obeid, Tesniere et al. 2007, Fucikova, Kralikova et al. 2011, Martins, Kepp et al. 2011, Garg, Krysko et al. 2012). Nous avons démontré à travers nos travaux, que l'exposition de la CRT à la membrane plasmique n'était pas seulement régulée par des mécanismes intrinsèques à la cellule, mais également par des facteurs solubles qui opèrent de façon autocrine ou paracrine. Nous avons montré que les phéromones de levure pouvaient stimuler la relocalisation de Cne1p, orthologue de la CRT chez la levure, à la périphérie de la cellule. Nos résultats indiquent que Cne1p n'est pas absolument nécessaire pour la reproduction des levures, mais facilite l'interaction entre les cellules. Ces premiers résultats sont en continuité d'autres travaux ayant montré l'implication de l'exposition de la CRT à la surface cellulaire dans la fertilisation des ovocytes par les spermatozoïdes (Nakamura, Moriya et al. 1993, Park, Lee et al. 2001). En extrapolant nos résultats du système de la levure au système de mammifères, nous avons découvert une série de facteurs solubles agissant sur les récepteurs couplés à la protéine G facilitant l'exposition de la CRT à la surface cellulaire. Parmi ces facteurs solubles, le facteur humain CXCL8 et son orthologue murin Cxcl2 possèdent la capacité de stimuler l'exposition de la CRT à la surface des cellules cancéreuses via leur récepteur CXCR1/Cxcr1 et CXCR2/Cxcr2. Du fait que le génome de mammifère code des centaines de GPCRs, nous suspectons l'implication de d'autres ligands et récepteurs de la même classe dans l'exposition de la CRT. Il serait nécessaire pour cela de procéder à des recherches similaires de façon systématique.

CXCL8, ainsi que d'autres chimiokines, sont souvent produites de façon constitutive dans les cellules cancéreuses, et agissent en auto ou paracrine pour induire une réponse

inflammatoire et immunitaire locale. Il est important de noter que ces médiateurs entretiennent une relation étroite avec leur microenvironnement. De ce fait, leur relation avec l'oncogénèse, l'apoptose, la progression tumorale et l'immunosurveillance sont très importantes et hautement complexes (Verbeke, Struyf et al. 2011). Une production élevée de CXCL8 caractérise ainsi un phénotype associé à la sénescence. De ce fait, les cellules tumorales sénescentes ou les fibroblastes associés à la tumeur peuvent initier un microenvironnement enrichi en CXCL8. Il a été reporté dans certains types de cancers, par exemple le cancer du sein, qu'un taux élevé de CXCL8, qui permet un échappement des cellules tumorales à l'inhibition de croissance induite par la rapamycine, était associé à un mauvais pronostic du patient (Britschgi, Andraos et al. 2012).

Il apparaît ainsi paradoxal que le système CXCL8/CXCR1-2 puisse être (souvent) constitutivement actif dans les cellules cancéreuses, prônant des effets pro-tumorigènes, mais puisse également être hyper-activé par une chimiothérapie immunogénique induisant l'exposition de la CRT et amenant à une mort cellulaire immunogène. De précédents travaux ont montré que la radiothérapie pouvait également stimuler la production de CXCL8 (Hei, Zhou et al. 2011). En effet, la radiothérapie locale peut engendrer un effet à distance, qui consiste à la régression de lésions ou de métastases qui n'ont pas été irradiées. Cette réponse reflète sûrement une réponse immunitaire anti-tumorale systémique qui résulte en la mort immunogénique des cellules cancéreuses initiales tuées par irradiation (Frey, Rubner et al. 2012). Cependant, l'implication de CXCL8 dans cette dernière observation reste à prouver.

Nous pouvons noter que le BCG (Bacilles Calmette-Guérin) qui est une forme vivante mais atténuée de *Mycobacterium bovis*, a été utilisé comme traitement immuno-thérapeutique anticancéreux après ablation transurétrale de carcinome superficiel urothélial (Galluzzi, Vacchelli et al. 2012). Ce traitement s'est avéré particulièrement efficace quand les cellules T spécifiques du BCG ont été activées pour produire de l'IFN $\gamma$ , sûrement au sein de lésions tumorales résiduelles ou dans les nœuds lymphatiques (Biot, Rentsch et al. 2012). La concentration de CXCL8 dans les urines constituerait donc un bio-marqueur précoce des réponses immunitaires et pourrait prédire le pronostic thérapeutique (Thalmann, Sermier et al. 2000). Le BCG induit la mort apoptotique des cellules cancéreuses soit directement, soit par activation des effecteurs immunitaires cellulaires ou humoraux (DiPaola and Lattime 2007). Nous

pouvons donc supposer qu'en induisant la mort cellulaire immunogénique, CXCL8 occuperait un rôle décisif dans l'efficacité de la thérapie par le BCG.

Outre le rôle d'IL-8 dans l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire, les cytokines jouent un rôle crucial dans la mise en place de la réponse immunitaire. En effet, Cullen *et al.*, ont montré dans des travaux publiés en 2013, que lors d'une mort cellulaire apoptotique par activation de Fas/CD95, les cellules mourantes sécrétaient de nombreuses cytokines, dont IL-8, qui agissaient ensuite comme un signal de chimiotaxie pour les cellules phagocytaires. Ces cytokines agiraient donc comme des signaux « find me » au même titre que la libération d'ATP *via* les canaux pannexines, permettant ainsi la survenue de la mort immunogénique. Cependant, il n'a pas encore été montré de liens entre l'ATP et la chimiotaxie induite par les cytokines (Cullen, Henry et al. 2013).

En conclusion de ce travail, nous avons montré une contribution inattendue des chimiokines dans l'exposition de la CRT à la surface cellulaire et dans la mort cellulaire immunogène. Il serait par la suite intéressant d'étudier si d'autres cytokines proinflammatoires sont impliquées dans l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire, et *vice versa*, si lors d'une mort cellulaire immunogénique, après traitement des cellules par les anthracyclines ou l'oxaliplatine, nous retrouvons une production importante de cytokines telles que IL-8 ou MCP-1 dans le surnageant des cellules.

Nous pourrions également étudier le rôle d'IL-8 et des futures cytokines potentiellement impliquées dans l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire dans le processus de libération d'ATP.

Nous pouvons supposer que ces découvertes pourraient avoir, dans le futur, des implications majeures dans la compréhension des réponses immunitaires antitumorales mais également dans la compréhension de leur modulation thérapeutiques. D'autre part, en continuité des travaux publiés par Martins *et al.*, nous avons montré une nouvelle possibilité de combler l'incapacité qu'ont certaines chimiothérapies à induire l'exposition de la CRT à la surface membranaire.

Etant la première cause de mortalité en France, la lutte contre le cancer reste une priorité absolue dans le domaine de la santé. Améliorer les traitements proposés aux patients pour aller vers une chimiothérapie personnalisée constitue l'objectif à atteindre.

C'est dans cette optique que notre laboratoire a mis en évidence l'immunogénicité de certaines chimiothérapies.

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse nous a permis de comprendre plus en détails les mécanismes moléculaires nécessaires à la survenue de deux étapes clefs de la mort cellulaire immunogène. Ceci permettrait de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques dans le futur, et palier à un manque de sécrétion d'ATP ou d'exposition de la calréticuline grâce aux différents facteurs et voies identifiées lorsque les chimiothérapies utilisées ne sont pas immunogènes ou lorsque le patient présente une déficience dans une de ces voies. Ainsi, ces premiers travaux fondamentaux pourraient permettre de nouvelles recherches ciblées sur l'élaboration de nouvelles drogues permettant l'activation des canaux pannexines 1 ou l'exocytose des autophagolysosomes pour combler une déficience en libération d'ATP, et sur de nouveaux composés qui compenseraient une déficience en exposition de la calréticuline.

## Références bibliographiques

- Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1994). "Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?" *Pharmacol Ther* **64**(3): 445-475.
- Ainscow, E. K., S. Mirshamsi, T. Tang, M. L. Ashford and G. A. Rutter (2002). "Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K(+) channels." *J Physiol* **544**(Pt 2): 429-445.
- Allavena, P., A. Sica, C. Garlanda and A. Mantovani (2008). "The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance." *Immunol Rev* **222**: 155-161.
- Alvaro, T., M. Lejeune, M. T. Salvado, R. Bosch, J. F. Garcia, J. Jaen, A. H. Banham, G. Roncador, C. Montalban and M. A. Piris (2005). "Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells." *Clin Cancer Res* **11**(4): 1467-1473.
- Ammirante, M., J. L. Luo, S. Grivennikov, S. Nedospasov and M. Karin (2010). "B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer." *Nature* **464**(7286): 302-305.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J. P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. Andre, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer and L. Zitvogel (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." *Nat Med* **13**(9): 1050-1059.
- Apte, R. N. and E. Voronov (2008). "Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy?" *Immunol Rev* **222**: 222-241.
- Badoual, C., S. Hans, W. H. Fridman, D. Brasnu, S. Erdman and E. Tartour (2009). "Revisiting the prognostic value of regulatory T cells in patients with cancer." *J Clin Oncol* **27**(19): e5-6; author reply e7.
- Badoual, C., S. Hans, J. Rodriguez, S. Peyrard, C. Klein, H. Agueznay Nel, V. Mosseri, O. Laccourreye, P. Bruneval, W. H. Fridman, D. F. Brasnu and E. Tartour (2006). "Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers." *Clin Cancer Res* **12**(2): 465-472.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Bao, L., S. Locovei and G. Dahl (2004). "Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP." *FEBS Lett* **572**(1-3): 65-68.
- Baranova, A., D. Ivanov, N. Petrash, A. Pestova, M. Skoblov, I. Kelmanson, D. Shagin, S. Nazarenko, E. Geraymovych, O. Litvin, A. Tiunova, T. L. Born, N. Usman, D. Staroverov, S. Lukyanov and Y. Panchin (2004). "The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins." *Genomics* **83**(4): 706-716.
- Barbe, M. T., H. Monyer and R. Bruzzone (2006). "Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels." *Physiology (Bethesda)* **21**: 103-114.
- Basu, S., R. J. Binder, T. Ramalingam and P. K. Srivastava (2001). "CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin." *Immunity* **14**(3): 303-313.
- Biot, C., C. A. Rentsch, J. R. Gsponer, F. D. Birkhauser, H. Jusforgues-Saklani, F. Lemaitre, C. Auriau, A. Bachmann, P. Bousso, C. Demangel, L. Peduto, G. N. Thalmann and M. L. Albert

(2012). "Preexisting BCG-specific T cells improve intravesical immunotherapy for bladder cancer." *Sci Transl Med* **4**(137): 137ra172.

Birkeland, S. A., H. H. Storm, L. U. Lamm, L. Barlow, I. Blohme, B. Forsberg, B. Eklund, O. Fjeldborg, M. Friedberg, L. Frodin and et al. (1995). "Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986." *Int J Cancer* **60**(2): 183-189.

Boassa, D., C. Ambrosi, F. Qiu, G. Dahl, G. Gaietta and G. Sosinsky (2007). "Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane." *J Biol Chem* **282**(43): 31733-31743.

Britschgi, A., R. Andraos, H. Brinkhaus, I. Klebba, V. Romanet, U. Muller, M. Murakami, T. Radimerski and M. Bentires-Alj (2012). "JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer." *Cancer Cell* **22**(6): 796-811.

Brouckaert, G., M. Kalai, D. V. Krysko, X. Saelens, D. Vercammen, M. N. Ndlovu, G. Haegeman, K. D'Herde and P. Vandenabeele (2004). "Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production." *Mol Biol Cell* **15**(3): 1089-1100.

Bruchard, M., G. Mignot, V. Derangere, F. Chalmin, A. Chevriaux, F. Vegran, W. Boireau, B. Simon, B. Ryffel, J. L. Connat, J. Kanellopoulos, F. Martin, C. Rebe, L. Apetoh and F. Ghiringhelli (2013). "Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth." *Nat Med* **19**(1): 57-64.

Bunt, S. K., L. Yang, P. Sinha, V. K. Clements, J. Leips and S. Ostrand-Rosenberg (2007). "Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression." *Cancer Res* **67**(20): 10019-10026.

Burnstock, G. (1972). "Purinergic nerves." *Pharmacol Rev* **24**(3): 509-581.

Burnstock, G. (2007). "Purine and pyrimidine receptors." *Cell Mol Life Sci* **64**(12): 1471-1483.

Burnstock, G. (2012). "Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future." *Bioessays* **34**(3): 218-225.

Burnstock, G. and C. Kennedy (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?" *Gen Pharmacol* **16**(5): 433-440.

Cain, K., S. B. Bratton and G. M. Cohen (2002). "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex." *Biochimie* **84**(2-3): 203-214.

Carmi, Y., G. Rinott, S. Dotan, M. Elkabets, P. Rider, E. Voronov and R. N. Apte (2011). "Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis." *J Immunol* **186**(6): 3462-3471.

Carreras, J., A. Lopez-Guillermo, B. C. Fox, L. Colomo, A. Martinez, G. Roncador, E. Montserrat, E. Campo and A. H. Banham (2006). "High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma." *Blood* **108**(9): 2957-2964.

Casares, N., M. O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Metivier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel and G. Kroemer (2005). "Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death." *J Exp Med* **202**(12): 1691-1701.

Chautan, M., G. Chazal, F. Cecconi, P. Gruss and P. Golstein (1999). "Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway." *Curr Biol* **9**(17): 967-970.



Chekeni, F. B., M. R. Elliott, J. K. Sandilos, S. F. Walk, J. M. Kinchen, E. R. Lazarowski, A. J. Armstrong, S. Penuela, D. W. Laird, G. S. Salvesen, B. E. Isakson, D. A. Bayliss and K. S. Ravichandran (2010). "Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis." *Nature* **467**(7317): 863-867.

Chen, J. G., J. C. Xia, X. T. Liang, K. Pan, W. Wang, L. Lv, J. J. Zhao, Q. J. Wang, Y. Q. Li, S. P. Chen, J. He, L. X. Huang, M. L. Ke, Y. B. Chen, H. Q. Ma, Z. W. Zeng, Z. W. Zhou, A. E. Chang and Q. Li (2011). "Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients." *Int J Biol Sci* **7**(1): 53-60.

Chen, X., J. Wan, J. Liu, W. Xie, X. Diao, J. Xu, B. Zhu and Z. Chen (2010). "Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients." *Lung Cancer* **69**(3): 348-354.

Chen, Y., R. Corriden, Y. Inoue, L. Yip, N. Hashiguchi, A. Zinkernagel, V. Nizet, P. A. Insel and W. G. Junger (2006). "ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors." *Science* **314**(5806): 1792-1795.

Chow, M. T., A. Moller and M. J. Smyth (2012). "Inflammation and immune surveillance in cancer." *Semin Cancer Biol* **22**(1): 23-32.

Collison, L. W., M. R. Pillai, V. Chaturvedi and D. A. Vignali (2009). "Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner." *J Immunol* **182**(10): 6121-6128.

Cullen, S. P., C. M. Henry, C. J. Kearney, S. E. Logue, M. Feoktistova, G. A. Tynan, E. C. Lavelle, M. Leverkus and S. J. Martin (2013). "Fas/CD95-induced chemokines can serve as 'find-me' signals for apoptotic cells." *Mol Cell* **49**(6): 1034-1048.

Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen and W. Zou (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* **10**(9): 942-949.

Davis, I. C., W. M. Sullender, J. M. Hickman-Davis, J. R. Lindsey and S. Matalon (2004). "Nucleotide-mediated inhibition of alveolar fluid clearance in BALB/c mice after respiratory syncytial virus infection." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**(1): L112-120.

de La Motte Rouge, T., L. Galluzzi, K. A. Olaussen, Y. Zermati, E. Tasdemir, T. Robert, H. Ripoche, V. Lazar, P. Dessen, F. Harper, G. Pierron, G. Pinna, N. Araujo, A. Harel-Belan, J. P. Armand, T. W. Wong, J. C. Soria and G. Kroemer (2007). "A novel epidermal growth factor receptor inhibitor promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells resistant to erlotinib." *Cancer Res* **67**(13): 6253-6262.

de Martel, C. and S. Franceschi (2009). "Infections and cancer: established associations and new hypotheses." *Crit Rev Oncol Hematol* **70**(3): 183-194.

Degenhardt, K., R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. Gelinas, Y. Fan, D. A. Nelson, S. Jin and E. White (2006). "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis." *Cancer Cell* **10**(1): 51-64.

Diaz-Montero, C. M., M. L. Salem, M. I. Nishimura, E. Garrett-Mayer, D. J. Cole and A. J. Montero (2009). "Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy." *Cancer Immunol Immunother* **58**(1): 49-59.

Didelot, C., D. Lanneau, M. Brunet, A. L. Joly, A. De Thonel, G. Chiosis and C. Garrido (2007). "Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins." *Curr Med Chem* **14**(27): 2839-2847.

Dighe, A. S., E. Richards, L. J. Old and R. D. Schreiber (1994). "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors." *Immunity* **1**(6): 447-456.

DiPaola, R. S. and E. C. Lattime (2007). "Bacillus Calmette-Guerin mechanism of action: the role of immunity, apoptosis, necrosis and autophagy." *J Urol* **178**(5): 1840-1841.

Dranoff, G. (2004). "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **4**(1): 11-22.

Dunn, G. P., C. M. Koebel and R. D. Schreiber (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting." *Nat Rev Immunol* **6**(11): 836-848.

Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The three Es of cancer immunoediting." *Annu Rev Immunol* **22**: 329-360.

Elliott, M. R., F. B. Chekeni, P. C. Trampont, E. R. Lazarowski, A. Kadl, S. F. Walk, D. Park, R. I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J. J. Lysiak, T. K. Harden, N. Leitinger and K. S. Ravichandran (2009). "Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance." *Nature* **461**(7261): 282-286.

Engel, A. M., I. M. Svane, J. Rygaard and O. Werdelin (1997). "MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice." *Scand J Immunol* **45**(5): 463-470.

Fader, C. M., M. O. Aguilera and M. I. Colombo (2012). "ATP is released from autophagic vesicles to the extracellular space in a VAMP7-dependent manner." *Autophagy* **8**(12): 1741-1756.

Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton and P. M. Henson (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." *J Immunol* **148**(7): 2207-2216.

Festjens, N., T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1371-1387.

Franz, S., K. Herrmann, B. G. Furnrohr, A. Sheriff, B. Frey, U. S. Gaipl, R. E. Voll, J. R. Kalden, H. M. Jack and M. Herrmann (2007). "After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes." *Cell Death Differ* **14**(4): 733-742.

Frey, B., Y. Rubner, R. Wunderlich, E. M. Weiss, A. G. Pockley, R. Fietkau and U. S. Gaipl (2012). "Induction of abscopal anti-tumor immunity and immunogenic tumor cell death by ionizing irradiation - implications for cancer therapies." *Curr Med Chem* **19**(12): 1751-1764.

Fridlender, Z. G. and S. M. Albelda (2012). "Tumor-associated neutrophils: friend or foe?" *Carcinogenesis* **33**(5): 949-955.

Fridman, W. H., F. Pages, C. Sautès-Fridman and J. Galon (2012). "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 298-306.

Fucikova, J., P. Kralikova, A. Fialova, T. Brtnicky, L. Rob, J. Bartunkova and R. Spisek (2011). "Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response." *Cancer Res* **71**(14): 4821-4833.

Galluzzi, L., S. A. Aaronson, J. Abrams, E. S. Alnemri, D. W. Andrews, E. H. Baehrecke, N. G. Bazan, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D. E. Bredesen, C. Brenner, M. Castedo, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, V. De Laurenzi, R. De Maria, M. Deshmukh, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, R. A. Flavell, S. Fulda, C. Garrido, P. Golstein, M. L. Gougeon, D. R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, M. O. Hengartner, H. Ichijo, M.

Jaattela, O. Kepp, A. Kimchi, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kornbluth, S. Kumar, B. Levine, S. A. Lipton, E. Lugli, F. Madeo, W. Malomi, J. C. Marine, S. J. Martin, J. P. Medema, P. Mehlen, G. Melino, U. M. Moll, E. Morselli, S. Nagata, D. W. Nicholson, P. Nicotera, G. Nunez, M. Oren, J. Penninger, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, J. H. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, R. Rizzuto, C. M. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, L. Scorrano, H. U. Simon, H. Steller, J. Tschopp, Y. Tsujimoto, P. Vandenabeele, I. Vitale, K. H. Vousden, R. J. Youle, J. Yuan, B. Zhivotovsky and G. Kroemer (2009). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes." Cell Death Differ **16**(8): 1093-1107.

Galluzzi, L., L. Senovilla, L. Zitvogel and G. Kroemer (2012). "The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs." Nat Rev Drug Discov **11**(3): 215-233.

Galluzzi, L., E. Vacchelli, A. Eggermont, W. H. Fridman, J. Galon, C. Sautes-Fridman, E. Tartour, L. Zitvogel and G. Kroemer (2012). "Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy." Oncoimmunology **1**(5): 699-716.

Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ **19**(1): 107-120.

Galluzzi, L., N. Zamzami, T. de La Motte Rouge, C. Lemaire, C. Brenner and G. Kroemer (2007). "Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis." Apoptosis **12**(5): 803-813.

Garg, A. D., D. V. Krysko, T. Verfaillie, A. Kaczmarek, G. B. Ferreira, T. Marysael, N. Rubio, M. Firczuk, C. Mathieu, A. J. Roebroek, W. Annaert, J. Golab, P. de Witte, P. Vandenabeele and P. Agostinis (2012). "A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death." EMBO J **31**(5): 1062-1079.

Garrido, C. and G. Kroemer (2004). "Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 639-646.

Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J. L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N. M. McLaughlin, N. M. Haynes, M. J. Smyth, G. Kroemer and L. Zitvogel (2009). "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors." Nat Med **15**(10): 1170-1178.

Ghiringhelli, F., M. Bruchard, F. Chalmin and C. Rebe (2012). "Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape." J Biomed Biotechnol **2012**: 473712.

Giaume, C., L. Leybaert, C. C. Naus and J. C. Saez (2013). "Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles." Front Pharmacol **4**: 88.

Girardi, M., D. E. Oppenheim, C. R. Steele, J. M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R. E. Tigelaar and A. C. Hayday (2001). "Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells." Science **294**(5542): 605-609.

Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.

Gonzales, E., B. Julien, V. Serriere-Lanneau, A. Nicou, I. Doignon, L. Lagoudakis, I. Garcin, D. Azoulay, J. C. Duclos-Vallee, D. Castaing, D. Samuel, A. Hernandez-Garcia, S. S. Awad, L.

Combettes, S. Thevananther and T. Tordjmann (2010). "ATP release after partial hepatectomy regulates liver regeneration in the rat." *J Hepatol* **52**(1): 54-62.

Gregory, C. D. and J. D. Pound (2010). "Microenvironmental influences of apoptosis in vivo and in vitro." *Apoptosis* **15**(9): 1029-1049.

Gregory, C. D. and J. D. Pound (2011). "Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues." *J Pathol* **223**(2): 177-194.

Grinberg, S., G. Hasko, D. Wu and S. J. Leibovich (2009). "Suppression of PLCbeta2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype." *Am J Pathol* **175**(6): 2439-2453.

Grivennikov, S. I., F. R. Greten and M. Karin (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." *Cell* **140**(6): 883-899.

Groh, V., J. Wu, C. Yee and T. Spies (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." *Nature* **419**(6908): 734-738.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

Hei, T. K., H. Zhou, Y. Chai, B. Ponnaiya and V. N. Ivanov (2011). "Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications." *Curr Mol Pharmacol* **4**(2): 96-105.

Hill, M. M., C. Adrain, P. J. Duriez, E. M. Creagh and S. J. Martin (2004). "Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes." *EMBO J* **23**(10): 2134-2145.

Hinrichs, C. S., A. Kaiser, C. M. Paulos, L. Cassard, L. Sanchez-Perez, B. Heemskerk, C. Wrzesinski, Z. A. Borman, P. Muranski and N. P. Restifo (2009). "Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity." *Blood* **114**(3): 596-599.

Janku, F., D. J. McConkey, D. S. Hong and R. Kurzrock (2011). "Autophagy as a target for anticancer therapy." *Nat Rev Clin Oncol* **8**(9): 528-539.

Joly, A. L., G. Wettstein, G. Mignot, F. Ghiringhelli and C. Garrido (2010). "Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity." *J Innate Immun* **2**(3): 238-247.

Junger, W. G. (2011). "Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling." *Nat Rev Immunol* **11**(3): 201-212.

Kastelein, R. A., C. A. Hunter and D. J. Cua (2007). "Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation." *Annu Rev Immunol* **25**: 221-242.

Kepp, O., L. Galluzzi, M. Lipinski, J. Yuan and G. Kroemer (2011). "Cell death assays for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* **10**(3): 221-237.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.

Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nat Immunol* **3**(11): 999-1005.

Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green and D. D. Newmeyer (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* **275**(5303): 1132-1136.

Kobara, M., N. Sunagawa, M. Abe, N. Tanaka, H. Toba, H. Hayashi, N. Keira, T. Tatsumi, H. Matsubara and T. Nakata (2008). "Apoptotic myocytes generate monocyte

chemoattractant protein-1 and mediate macrophage recruitment." J Appl Physiol (1985) **104**(3): 601-609.

Koebel, C. M., W. Vermi, J. B. Swann, N. Zerafa, S. J. Rodig, L. J. Old, M. J. Smyth and R. D. Schreiber (2007). "Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state." Nature **450**(7171): 903-907.

Kroemer, G., W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, G. Melino and D. Nomenclature Committee on Cell (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1463-1467.

Kroemer, G., L. Galluzzi and C. Brenner (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.

Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp and L. Zitvogel (2013). "Immunogenic cell death in cancer therapy." Annu Rev Immunol **31**: 51-72.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschoop, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino and D. Nomenclature Committee on Cell (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.

Kroemer, G. and J. Pouyssegur (2008). "Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel." Cancer Cell **13**(6): 472-482.

Kryczek, I., M. Banerjee, P. Cheng, L. Vatan, W. Szeliga, S. Wei, E. Huang, E. Finlayson, D. Simeone, T. H. Welling, A. Chang, G. Coukos, R. Liu and W. Zou (2009). "Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments." Blood **114**(6): 1141-1149.

Krysko, D. V., A. D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis and P. Vandenabeele (2012). "Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy." Nat Rev Cancer **12**(12): 860-875.

Lauber, K., E. Bohn, S. M. Krober, Y. J. Xiao, S. G. Blumenthal, R. K. Lindemann, P. Marini, C. Wiedig, A. Zobywalski, S. Baksh, Y. Xu, I. B. Autenrieth, K. Schulze-Osthoff, C. Belka, G. Stuhler and S. Wesselborg (2003). "Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal." Cell **113**(6): 717-730.

Leffers, N., M. J. Gooden, R. A. de Jong, B. N. Hoogbeem, K. A. ten Hoor, H. Hollema, H. M. Boezen, A. G. van der Zee, T. Daemen and H. W. Nijman (2009). "Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer." Cancer Immunol Immunother **58**(3): 449-459.

Leist, M., B. Single, A. F. Castoldi, S. Kuhnle and P. Nicotera (1997). "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis." J Exp Med **185**(8): 1481-1486.

Li, A., J. Banerjee, C. T. Leung, K. Peterson-Yantorno, W. D. Stamer and M. M. Civan (2011). "Mechanisms of ATP release, the enabling step in purinergic dynamics." Cell Physiol Biochem **28**(6): 1135-1144.

Li, G., X. Liang and M. T. Lotze (2013). "HMGB1: The Central Cytokine for All Lymphoid Cells." Front Immunol **4**: 68.

Liu, J., Y. Duan, X. Cheng, X. Chen, W. Xie, H. Long, Z. Lin and B. Zhu (2011). "IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma." Biochem Biophys Res Commun **407**(2): 348-354.

Liu, Y. J. (2001). "Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity." *Cell* **106**(3): 259-262.

Lum, J. J., D. E. Bauer, M. Kong, M. H. Harris, C. Li, T. Lindsten and C. B. Thompson (2005). "Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis." *Cell* **120**(2): 237-248.

Lv, L., K. Pan, X. D. Li, K. L. She, J. J. Zhao, W. Wang, J. G. Chen, Y. B. Chen, J. P. Yun and J. C. Xia (2011). "The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma." *PLoS One* **6**(3): e18219.

MacKie, R. M., R. Reid and B. Junor (2003). "Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery." *N Engl J Med* **348**(6): 567-568.

Martins, I., O. Kepp, F. Schlemmer, S. Adjemian, M. Tailler, S. Shen, M. Michaud, L. Menger, A. Gdoura, N. Tajeddine, A. Tesniere, L. Zitvogel and G. Kroemer (2011). "Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress." *Oncogene* **30**(10): 1147-1158.

Martins, I., A. Tesniere, O. Kepp, M. Michaud, F. Schlemmer, L. Senovilla, C. Seror, D. Metivier, J. L. Perfettini, L. Zitvogel and G. Kroemer (2009). "Chemotherapy induces ATP release from tumor cells." *Cell Cycle* **8**(22): 3723-3728.

Michaud, M., I. Martins, A. Q. Sukkurwala, S. Adjemian, Y. Ma, P. Pellegatti, S. Shen, O. Kepp, M. Scoazec, G. Mignot, S. Rello-Varona, M. Tailler, L. Menger, E. Vacchelli, L. Galluzzi, F. Ghiringhelli, F. di Virgilio, L. Zitvogel and G. Kroemer (2011). "Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice." *Science* **334**(6062): 1573-1577.

Miller, J. S., T. Cervenka, J. Lund, I. J. Okazaki and J. Moss (1999). "Purine metabolites suppress proliferation of human NK cells through a lineage-specific purine receptor." *J Immunol* **162**(12): 7376-7382.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136**(7): 2348-2357.

Mullick, A., Y. Xu, R. Warren, M. Koutroumanis, C. Guilbault, S. Broussau, F. Malenfant, L. Bourget, L. Lamoureux, R. Lo, A. W. Caron, A. Pilotte and B. Massie (2006). "The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells." *BMC Biotechnol* **6**: 43.

Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura and H. Ohtani (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." *Cancer Res* **58**(16): 3491-3494.

Nakamura, M., M. Moriya, T. Baba, Y. Michikawa, T. Yamanobe, K. Arai, S. Okinaga and T. Kobayashi (1993). "An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm." *Exp Cell Res* **205**(1): 101-110.

Novitskiy, S. V., S. Ryzhov, R. Zaynagetdinov, A. E. Goldstein, Y. Huang, O. Y. Tikhomirov, M. R. Blackburn, I. Biaggioni, D. P. Carbone, I. Feoktistov and M. M. Dikov (2008). "Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function." *Blood* **112**(5): 1822-1831.

Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J. L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel and G. Kroemer (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." *Nat Med* **13**(1): 54-61.

Ogata, M., S. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kanemoto, T. Murakami, M. Taniguchi, I. Tanii, K. Yoshinaga, S. Shiosaka, J. A. Hammarback, F. Urano and K. Imaizumi

(2006). "Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress." *Mol Cell Biol* **26**(24): 9220-9231.

Panaretakis, T., N. Joza, N. Modjtahedi, A. Tesniere, I. Vitale, M. Durchschlag, G. M. Fimia, O. Kepp, M. Piacentini, K. U. Froehlich, P. van Endert, L. Zitvogel, F. Madeo and G. Kroemer (2008). "The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death." *Cell Death Differ* **15**(9): 1499-1509.

Park, B. J., D. G. Lee, J. R. Yu, S. K. Jung, K. Choi, J. Lee, J. Lee, Y. S. Kim, J. I. Lee, J. Y. Kwon, J. Lee, A. Singson, W. K. Song, S. H. Eom, C. S. Park, D. H. Kim, J. Bandyopadhyay and J. Ahnn (2001). "Calreticulin, a calcium-binding molecular chaperone, is required for stress response and fertility in *Caenorhabditis elegans*." *Mol Biol Cell* **12**(9): 2835-2845.

Pelegri, P. and A. Surprenant (2006). "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor." *EMBO J* **25**(21): 5071-5082.

Penn, I. (1995). "Solid tumors in cardiac allograft recipients." *Ann Thorac Surg* **60**(6): 1559-1560.

Penuela, S., R. Bhalla, X. Q. Gong, K. N. Cowan, S. J. Celetti, B. J. Cowan, D. Bai, Q. Shao and D. W. Laird (2007). "Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins." *J Cell Sci* **120**(Pt 21): 3772-3783.

Piccard, H., R. J. Muschel and G. Opdenakker (2012). "On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression." *Crit Rev Oncol Hematol* **82**(3): 296-309.

Qian, X., X. Wang and H. Jin (2014). "Cell Transfer Therapy for Cancer: Past, Present, and Future." *J Immunol Res* **2014**: 525913.

Qiu, F. and G. Dahl (2009). "A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP." *Am J Physiol Cell Physiol* **296**(2): C250-255.

Qu, Y., S. Misaghi, K. Newton, L. L. Gilmour, S. Louie, J. E. Cupp, G. R. Dubyak, D. Hackos and V. M. Dixit (2011). "Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation." *J Immunol* **186**(11): 6553-6561.

Raskovalova, T., X. Huang, M. Sitkovsky, L. C. Zacharia, E. K. Jackson and E. Gorelik (2005). "Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells." *J Immunol* **175**(7): 4383-4391.

Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 405-413.

Riteau, N., P. Gasse, L. Fauconnier, A. Gombault, M. Couegnat, L. Fick, J. Kanellopoulos, V. F. Quesniaux, S. Marchand-Adam, B. Crestani, B. Ryffel and I. Couillin (2010). "Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **182**(6): 774-783.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda and T. Takahashi (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunol Rev* **182**: 18-32.

Sandilos, J. K. and D. A. Bayliss (2012). "Physiological mechanisms for the modulation of pannexin 1 channel activity." *J Physiol* **590**(Pt 24): 6257-6266.

Sandilos, J. K., Y. H. Chiu, F. B. Chekeni, A. J. Armstrong, S. F. Walk, K. S. Ravichandran and D. A. Bayliss (2012). "Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region." *J Biol Chem* **287**(14): 11303-11311.

Scemes, E., D. C. Spray and P. Meda (2009). "Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemi-channels". " *Pflugers Arch* **457**(6): 1207-1226.

Schenk, U., A. M. Westendorf, E. Radaelli, A. Casati, M. Ferro, M. Fumagalli, C. Verderio, J. Buer, E. Scanziani and F. Grassi (2008). "Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels." Sci Signal **1**(39): ra6.

Segal-Bendirdjian, E., C. Dudognon, J. Mathieu, J. Hillion and F. Besancon (2005). "[Cell death signalling: recent advances and therapeutic application]." Bull Cancer **92**(1): 23-35.

Sheil, A. G., S. Flavel, A. P. Disney and T. H. Mathew (1985). "Cancer development in patients progressing to dialysis and renal transplantation." Transplant Proc **17**(2): 1685-1688.

Sica, A., P. Larghi, A. Mancino, L. Rubino, C. Porta, M. G. Totaro, M. Rimoldi, S. K. Biswas, P. Allavena and A. Mantovani (2008). "Macrophage polarization in tumour progression." Semin Cancer Biol **18**(5): 349-355.

Smyth, M. J., N. Y. Crowe and D. I. Godfrey (2001). "NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma." Int Immunol **13**(4): 459-463.

Smyth, M. J., G. P. Dunn and R. D. Schreiber (2006). "Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity." Adv Immunol **90**: 1-50.

Sridharan, M., S. P. Adderley, E. A. Bowles, T. M. Egan, A. H. Stephenson, M. L. Ellsworth and R. S. Sprague (2010). "Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(4): H1146-1152.

Strasser, A., P. J. Jost and S. Nagata (2009). "The many roles of FAS receptor signaling in the immune system." Immunity **30**(2): 180-192.

Stutman, O. (1974). "Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice." Science **183**(4124): 534-536.

Stutman, O. (1979). "Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose." J Natl Cancer Inst **62**(2): 353-358.

Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 621-632.

Teng, M. W., J. B. Swann, C. M. Koebel, R. D. Schreiber and M. J. Smyth (2008). "Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer." J Leukoc Biol **84**(4): 988-993.

Thalmann, G. N., A. Sermier, C. Rentsch, K. Mohrle, M. G. Cecchini and U. E. Studer (2000). "Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin." J Urol **164**(6): 2129-2133.

Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-146.

van Deventer, H. W., J. E. Burgents, Q. P. Wu, R. M. Woodford, W. J. Brickey, I. C. Allen, E. McElvania-Tekippe, J. S. Serody and J. P. Ting (2010). "The inflammasome component NLRP3 impairs antitumor vaccine by enhancing the accumulation of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells." Cancer Res **70**(24): 10161-10169.

Velasquez, S. and E. A. Eugenin (2014). "Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases." Front Physiol **5**: 96.

Verbeke, H., S. Struyf, G. Laureys and J. Van Damme (2011). "The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer." Cytokine Growth Factor Rev **22**(5-6): 345-358.

Vivier, E., S. Ugolini, D. Blaise, C. Chabannon and L. Brossay (2012). "Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer." Nat Rev Immunol **12**(4): 239-252.



Walker, M. R., D. J. Kasproicz, V. H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J. H. Buckner and S. F. Ziegler (2003). "Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells." J Clin Invest **112**(9): 1437-1443.

Wang, L., T. Yi, M. Kortylewski, D. M. Pardoll, D. Zeng and H. Yu (2009). "IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway." J Exp Med **206**(7): 1457-1464.

Wang, Y., I. Martins, Y. Ma, O. Kepp, L. Galluzzi and G. Kroemer (2013). "Autophagy-dependent ATP release from dying cells via lysosomal exocytosis." Autophagy **9**(10): 1624-1625.

White, E. (2012). "Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer." Nat Rev Cancer **12**(6): 401-410.

Wiley, J. S., R. Sluyter, B. J. Gu, L. Stokes and S. J. Fuller (2011). "The human P2X7 receptor and its role in innate immunity." Tissue Antigens **78**(5): 321-332.

Woehrle, T., L. Yip, A. Elkhail, Y. Sumi, Y. Chen, Y. Yao, P. A. Insel and W. G. Junger (2010). "Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse." Blood **116**(18): 3475-3484.

Yang, C. S., D. M. Shin and E. K. Jo (2012). "The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases." Int Neurol **16**(1): 2-12.

Zamai, L., C. Ponti, P. Mirandola, G. Gobbi, S. Papa, L. Galeotti, L. Cocco and M. Vitale (2007). "NK cells and cancer." J Immunol **178**(7): 4011-4016.

Zhang, L., J. R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P. A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M. N. Liebman, S. C. Rubin and G. Coukos (2003). "Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer." N Engl J Med **348**(3): 203-213.

Zhang, Z., G. Chen, W. Zhou, A. Song, T. Xu, Q. Luo, W. Wang, X. S. Gu and S. Duan (2007). "Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis." Nat Cell Biol **9**(8): 945-953.

Zitvogel, L., O. Kepp, L. Senovilla, L. Menger, N. Chaput and G. Kroemer (2010). "Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway." Clin Cancer Res **16**(12): 3100-3104.

## Mécanismes de libération d'ATP et d'exposition de la calréticuline au cours d'une chimiothérapie immunogène

Pendant très longtemps, les traitements contre les cancers se sont basés sur la cytotoxicité des chimiothérapies, sur leur capacité à tuer directement les cellules malignes ou à induire leur senescence. Mais cette cytotoxicité accrue et non ciblée a également pour effet de tuer les cellules du système immunitaire du patient. Cependant, il a été montré que la radiothérapie, les anthracyclines ainsi que l'oxaliplatine étaient capables d'induire une apoptose décrite comme étant une mort cellulaire immunogène. De ce fait, les cellules tumorales mourantes agiront comme vaccin thérapeutique.

La mort cellulaire immunogène se caractérise par trois grands marqueurs : un stress du réticulum endoplasmique pré-mortem qui va induire la translocation de la calréticuline de la lumière du réticulum endoplasmique vers la surface cellulaire, la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire permettant le recrutement des cellules dendritiques et l'activation de l'inflammasome NLRP3 *via* le récepteur P2RX7, et enfin la libération de la protéine HMGB1 dans le milieu extracellulaire, qui va aller interagir avec TLR4 à la surface des cellules dendritiques pour stimuler leur fonction présentatrice d'antigène.

La première partie de ce travail a consisté à comprendre les mécanismes moléculaires précis par lesquels l'ATP est sécrétée activement lors d'une mort cellulaire immunogène. En utilisant une combinaison de techniques impliquant des criblages pharmacologiques, des techniques de monitoring de la localisation intracellulaire de l'ATP entre autres, nous avons montré qu'après un traitement par les inducteurs de la mort immunogène, l'ATP était redistribué des lysosomes aux autolysosomes et que sa sécrétion requiert la protéine lysosomale LAMP1. Nous avons également montré qu'il existait d'autres voies de libération d'ATP telles que la voie de signalisation Rho, et également l'ouverture des hémicanaux pannexine 1 (PANX1). De façon surprenante, nous avons observé une implication de PANX1 dans la translocation de LAMP1 à la surface cellulaire. Ces résultats ont permis de comprendre un peu plus précisément les mécanismes de sécrétion d'ATP dans la mort cellulaire immunogène, mettant en évidence l'importance de l'exocytose lysosomale caspases dépendante et PANX1 dépendante.

La seconde partie de ce travail s'est portée sur l'étude d'une autre caractéristique de la mort cellulaire immunogène, à savoir l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire. En partant du constat qu'après un traitement par la mitoxantrone, la calréticuline était relocalisée en périphérie à la fois dans les cellules humaines et les cellules de levure, il a été suggéré que la voie d'exposition de la calréticuline était conservée phylogénétiquement. Nous avons montré que les phéromones pouvaient agir comme inducteurs physiologiques de l'exposition de la calréticuline dans les cellules de levure. Un criblage d'ARN interférant et des analyses de transcriptome nous ont permis de montrer que les chimiokines, en particulier CXCL8 chez l'humain (appelé également interleukine-8) et son orthologue Cxcl2 chez la souris étaient impliquées dans la translocation de la calréticuline à la surface cellulaire. En traitant les cellules cancéreuses par la mitoxantrone, nous observons une production de CXCL8 par les cellules cancéreuses humaines *in vitro* et de Cxcl2 par les cellules cancéreuses murines *in vivo*. Un « knockdown » des récepteurs pour CXCL8/Cxcl2 réduit de manière significative l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire. Ces résultats ont donc montré l'importance des chimiokines dans la voie d'exposition de la calréticuline.

L'ensemble de ce travail a permis de comprendre plus en détails deux des trois grandes caractéristiques de la mort cellulaire immunogène.